

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

NOTIFICATION OF ELECTION

(PCT Rule 61.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

Assistant Commissioner for Patents
 United States Patent and Trademark
 Office
 Box PCT
 Washington, D.C.20231
 ETATS-UNIS D'AMERIQUE

in its capacity as elected Office

Date of mailing (day/month/year) 21 August 2000 (21.08.00)	
International application No. PCT/NL99/00805	Applicant's or agent's file reference P10504PC00
International filing date (day/month/year) 24 December 1999 (24.12.99)	Priority date (day/month/year) 06 January 1999 (06.01.99)
Applicant HULST, Anne, Coenraad et al	

1. The designated Office is hereby notified of its election made:

☒ in the demand filed with the International Preliminary Examining Authority on:

26 June 2000 (26.06.00)

☐ in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:2. The election ☒ was☐ was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No.: (41-22) 740.14.35	Authorized officer Pascal Piriou Telephone No.: (41-22) 338.83.38
--	--

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

Applicant's or agent's file reference P10504PC00	FOR FURTHER ACTION		see Notification of Transmittal of International Search Report (Form PCT/ISA/220) as well as, where applicable, item 5 below.
International application No. PCT/NL 99/ 00805	International filing date (day/month/year) 24/12/1999	(Earliest) Priority Date (day/month/year) 06/01/1999	
Applicant COOPERATIEVE VERKOOP EN PRODUCTIEVERENIGING..et al			

This International Search Report has been prepared by this International Searching Authority and is transmitted to the applicant according to Article 18. A copy is being transmitted to the International Bureau.

This International Search Report consists of a total of 3 sheets.

☒ It is also accompanied by a copy of each prior art document cited in this report.

1. Basis of the report

a. With regard to the language, the international search was carried out on the basis of the international application in the language in which it was filed, unless otherwise indicated under this item.

☐ the international search was carried out on the basis of a translation of the international application furnished to this Authority (Rule 23.1(b)).

b. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of the sequence listing :

☐ contained in the international application in written form.

☐ filed together with the international application in computer readable form.

☐ furnished subsequently to this Authority in written form.

☐ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.

☐ the statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.

☐ the statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished

2. ☐ Certain claims were found unsearchable (See Box I).

3. ☐ Unity of invention is lacking (see Box II).

4. With regard to the title,

☒ the text is approved as submitted by the applicant.

☐ the text has been established by this Authority to read as follows:

5. With regard to the abstract,

☒ the text is approved as submitted by the applicant.

☐ the text has been established, according to Rule 38.2(b), by this Authority as it appears in Box III. The applicant may, within one month from the date of mailing of this international search report, submit comments to this Authority.

6. The figure of the drawings to be published with the abstract is Figure No.

☐ as suggested by the applicant.

☒ because the applicant failed to suggest a figure.

☐ because this figure better characterizes the invention.

8

☐ None of the figures.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PC/NL 99/00805

INVENTION SUBJECT MATTER
D01B1/42

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 D01B A01H A23J A23K C08B C13D D21D D01C

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 5 464 160 A (DONALD MC, D.R.) 7 November 1995 (1995-11-07) cited in the application column 1, line 7 - line 45 column 2, line 13 - line 48 column 3, line 61 - column 6, line 61; claims 1,4,6,8; figures 12-14	1,3,5, 8-10,12
Y		6,7 14-16, 19,21
A		
Y	DE 42 13 444 A (INSTITUT FÜR GENBIOLOGISCHE FORSCHUNG BERLIN GMBH) 28 October 1993 (1993-10-28) the whole document	6,7

-/-

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"Z" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

6 Apr11 2000

Date of mailing of the international search report

17/04/2000

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3018

Authorized officer

Munzer, E

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/NL 99/00805

DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>✓ NL 52 591 C (BÜHRMANN'S, G.H. PAPIERGROOTHANDEL) 15 January 1942 (1942-01-15) the whole document</p>	<p>1-5, 8-12, 19, 21</p>
A	<p>✓ US 4 481 355 A (JASKOWSKI, M.C.) 6 November 1984 (1984-11-06) , sentence 8 - sentence 63 column 4, line 60 - column 6, line 9; claims 1, 14; figure 1</p>	<p>1</p>
A	<p>✓ GB 658 129 A (WELCH, J.N.) the whole document</p>	<p>1, 11</p>

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/NL 99/00805

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 5464160	A	07-11-1995	NONE	
DE 4213444	A	28-10-1993	NONE	
NL 52591	C		NONE	
US 4481355	A	06-11-1984	BR 8405960 A CA 1209071 A US 4568739 A US 4617383 A	10-09-1985 05-08-1986 04-02-1986 14-10-1986
GB 658129	A		NONE	

From the
INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINING AUTHORITY

PCT

NOTIFICATION OF TRANSMITTAL OF
THE INTERNATIONAL PRELIMINARY
EXAMINATION REPORT

(PCT Rule 71.1)

To:

Mr Ir A.W. Prins, c.s.
c/o VEREENIGDE

NIEUWE PARKLAAN 97
2587 BN THE HAGUE

PAYS-BAS
3 MAART 2001

NRF₂ 6-7-2001

opie
naar

TERMIN

Beantwoord
voorl.

bericht gezonden
aan

Date of mailing
(day/month/year)

08.03.2001

def.

Applicant's or agent's file reference

MAP

P10504PC00

IMPORTANT NOTIFICATION

International application No.
PCT/NL99/00805

International filing date (day/month/year)
24/12/1999

Priority date (day/month/year)
06/01/1999

Applicant

COOPERATIEVE VERKOOP EN PRODUCTIEVERENIGING..et al

1. The applicant is hereby notified that this International Preliminary Examining Authority transmits herewith the international preliminary examination report and its annexes, if any, established on the international application.
2. A copy of the report and its annexes, if any, is being transmitted to the International Bureau for communication to all the elected Offices.
3. Where required by any of the elected Offices, the International Bureau will prepare an English translation of the report (but not of any annexes) and will transmit such translation to those Offices.

4. REMINDER

The applicant must enter the national phase before each elected Office by performing certain acts (filing translations and paying national fees) within 30 months from the priority date (or later in some Offices) (Article 39(1)) (see also the reminder sent by the International Bureau with Form PCT/IB/301).

Where a translation of the international application must be furnished to an elected Office, that translation must contain a translation of any annexes to the international preliminary examination report. It is the applicant's responsibility to prepare and furnish such translation directly to each elected Office concerned.

For further details on the applicable time limits and requirements of the elected Offices, see Volume II of the PCT Applicant's Guide.

Name and mailing address of the IPEA/

European Patent Office
D-80298 Munich
Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d
Fax: +49 89 2399 - 4465

Authorized officer

de Santiago Gomez, A

Tel. +49 89 2399-8224



PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)



Applicant's or agent's file reference P10504PC00	FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/NL99/00805	International filing date (day/month/year) 24/12/1999	Priority date (day/month/year) 06/01/1999
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC D01B1/42		
Applicant COOPERATIEVE VERKOOP EN PRODUCTIEVERENIGING..et al		

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.
2. This REPORT consists of a total of 4 sheets, including this cover sheet.

☐ This report is also accompanied by ANNEXES, i.e. sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).

 These annexes consist of a total of sheets.

3. This report contains indications relating to the following items:
 - I ☒ Basis of the report
 - II ☐ Priority
 - III ☐ Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
 - IV ☐ Lack of unity of invention
 - V ☒ Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
 - VI ☐ Certain documents cited
 - VII ☐ Certain defects in the international application
 - VIII ☒ Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 26/06/2000	Date of completion of this report 08.03.2001
Name and mailing address of the international preliminary examining authority:  European Patent Office D-80298 Munich Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465	Authorized officer Auer, H Telephone No. +49 89 2399 2054 

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No. PCT/NL99/00805

I. Basis of the report

1. This report has been drawn on the basis of *(substitute sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to the report since they do not contain amendments (Rules 70.16 and 70.17).):*
Description, pages:

1-37 as originally filed

Claims, No.:

1-21 as originally filed

Drawings, sheets:

1/7-7/7 as originally filed

2. With regard to the **language**, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item.

These elements were available or furnished to this Authority in the following language: , which is:

- ☐ the language of a translation furnished for the purposes of the international search (under Rule 23.1(b)).
- ☐ the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)).
- ☐ the language of a translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).

3. With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:

- ☐ contained in the international application in written form.
- ☐ filed together with the international application in computer readable form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in written form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.
- ☐ The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.
- ☐ The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

4. The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages:
- ☐ the claims, Nos.:

**INTERNATIONAL PRELIMINARY
EXAMINATION REPORT**

International application No. PCT/NL99/00805

☐ the drawings, sheets:

5. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed (Rule 70.2(c)):

(Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report.)

6. Additional observations, if necessary:

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Yes:	Claims	1-21
	No:	Claims	
Inventive step (IS)	Yes:	Claims	1-21
	No:	Claims	
Industrial applicability (IA)	Yes:	Claims	1-21
	No:	Claims	

2. Citations and explanations
see separate sheet

VIII. Certain observations on the international application

The following observations on the clarity of the claims, description, and drawings or on the question whether the claims are fully supported by the description, are made:
see separate sheet

**INTERNATIONAL PRELIMINARY
EXAMINATION REPORT - SEPARATE SHEET**

International application No. PCT/NL99/00805

ad V:

1. Most relevant prior art document is US-A-5464160, which is cited in the description and which discloses a hammermill where relatively dry material is separated into two fractions by neglecting the juice stream.

The problem of the invention is to provide a better method which can access the plant cell with higher efficiency and can make the cytosol fraction more available for recovery.

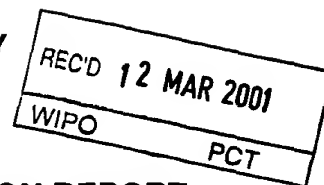
The solution is given by the combination of features of claim 1, i.e. in particular by separating the material into a fibre fraction and a juice stream.

There is no hint for this solution in US-A-5464160 nor in the other documents cited in the search report which disclose only technological background.
Claim 1 is, therefore, in line with Articles 33(2) and (3) PCT.

2. The subject-matter of the dependent claims contain further embodiments of the invention and is also in combination with the independent claims novel and inventive (Articles 33(2) and (3) PCT).


ad VIII:

3. Claims 9-21 seem to contain a problem of clarity since the subject-matter of these claims is not defined by real features.



INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference P10504PC00		FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/NL99/00805	International filing date (day/month/year) 24/12/1999	Priority date (day/month/year) 06/01/1999	
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC D01B1/42			
Applicant COOPERATIEVE VERKOOP EN PRODUCTIEVERENIGING..et al			
<p>1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.</p> <p>2. This REPORT consists of a total of 4 sheets, including this cover sheet.</p> <p><input type="checkbox"/> This report is also accompanied by ANNEXES, i.e. sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).</p> <p>These annexes consist of a total of sheets.</p>			
<p>3. This report contains indications relating to the following items:</p> <ul style="list-style-type: none">I <input checked="" type="checkbox"/> Basis of the reportII <input type="checkbox"/> PriorityIII <input type="checkbox"/> Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicabilityIV <input type="checkbox"/> Lack of unity of inventionV <input checked="" type="checkbox"/> Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statementVI <input type="checkbox"/> Certain documents citedVII <input type="checkbox"/> Certain defects in the international applicationVIII <input checked="" type="checkbox"/> Certain observations on the international application			
Date of submission of the demand 26/06/2000		Date of completion of this report 08.03.2001	
Name and mailing address of the international preliminary examining authority:  European Patent Office D-80298 Munich Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465		Authorized officer Auer, H Telephone No. +49 89 2399 2054	



**INTERNATIONAL PRELIMINARY
EXAMINATION REPORT**

International application No. PCT/NL99/00805

I. Basis of the report

1. This report has been drawn on the basis of *(substitute sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to the report since they do not contain amendments (Rules 70.16 and 70.17).):*

Description, pages:

1-37 as originally filed

Claims, No.:

1-21 as originally filed

Drawings, sheets:

1/7-7/7 as originally filed

2. With regard to the **language**, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item.

These elements were available or furnished to this Authority in the following language: , which is:

- ☐ the language of a translation furnished for the purposes of the international search (under Rule 23.1(b)).
- ☐ the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)).
- ☐ the language of a translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).

3. With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:

- ☐ contained in the international application in written form.
- ☐ filed together with the international application in computer readable form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in written form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.
- ☐ The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.
- ☐ The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

4. The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages:
- ☐ the claims, Nos.:

**INTERNATIONAL PRELIMINARY
EXAMINATION REPORT**

International application No. PCT/NL99/00805

☐ the drawings, sheets:

5. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed (Rule 70.2(c)):

(Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report.)

6. Additional observations, if necessary:

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Yes:	Claims	1-21
	No:	Claims	
Inventive step (IS)	Yes:	Claims	1-21
	No:	Claims	
Industrial applicability (IA)	Yes:	Claims	1-21
	No:	Claims	

2. Citations and explanations
see separate sheet

VIII. Certain observations on the international application

The following observations on the clarity of the claims, description, and drawings or on the question whether the claims are fully supported by the description, are made:
see separate sheet

**INTERNATIONAL PRELIMINARY
EXAMINATION REPORT - SEPARATE SHEET**

International application No. PCT/NL99/00805

ad V:

1. Most relevant prior art document is US-A-5464160, which is cited in the description and which discloses a hammermill where relatively dry material is separated into two fractions by neglecting the juice stream.

The problem of the invention is to provide a better method which can access the plant cell with higher efficiency and can make the cytosol fraction more available for recovery.

The solution is given by the combination of features of claim 1, i.e. in particular by separating the material into a fibre fraction and a juice stream.

There is no hint for this solution in US-A-5464160 nor in the other documents cited in the search report which disclose only technological background.

Claim 1 is, therefore, in line with Articles 33(2) and (3) PCT.

2. The subject-matter of the dependent claims contain further embodiments of the invention and is also in combination with the independent claims novel and inventive (Articles 33(2) and (3) PCT).

ad VIII:

3. Claims 9-21 seem to contain a problem of clarity since the subject-matter of these claims is not defined by real features.

From the
INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINING AUTHORITY

PCT

NOTIFICATION OF TRANSMITTAL OF
THE INTERNATIONAL PRELIMINARY
EXAMINATION REPORT
(PCT Rule 71.1)

To:		NIEUWE PARKLAAN 97 2587 BN THE HAGUE PAYS-BAS 3 MAART 2001 NRF ₂ 6-7-2001	
Mr Ir A.W. Prins, c.s. c/o VEREENIGDE			
Beantwoord voorl. def. MAP			
bericht gezonden aan			
Applicant's or agent's file reference		Date of mailing (day/month/year)	
P10504PC00		08.03.2001	
International application No.		International filing date (day/month/year)	
PCT/NL99/00805		24/12/1999	
Priority date (day/month/year)		06/01/1999	
Applicant			
COOPERATIEVE VERKOOP EN PRODUCTIEVERENIGING..et al			

IMPORTANT NOTIFICATION

1. The applicant is hereby notified that this International Preliminary Examining Authority transmits herewith the international preliminary examination report and its annexes, if any, established on the international application.
2. A copy of the report and its annexes, if any, is being transmitted to the International Bureau for communication to all the elected Offices.
3. Where required by any of the elected Offices, the International Bureau will prepare an English translation of the report (but not of any annexes) and will transmit such translation to those Offices.
4. **REMINDER**

The applicant must enter the national phase before each elected Office by performing certain acts (filing translations and paying national fees) within 30 months from the priority date (or later in some Offices) (Article 39(1)) (see also the reminder sent by the International Bureau with Form PCT/IB/301).

Where a translation of the international application must be furnished to an elected Office, that translation must contain a translation of any annexes to the international preliminary examination report. It is the applicant's responsibility to prepare and furnish such translation directly to each elected Office concerned.

For further details on the applicable time limits and requirements of the elected Offices, see Volume II of the PCT Applicant's Guide.

Name and mailing address of the IPEA/



European Patent Office
D-80298 Munich
Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d
Fax: +49 89 2399 - 4465

Authorized officer

de Santiago Gomez, A

Tel. +49 89 2399-8224





PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference P10504PC00		FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/NL99/00805	International filing date (day/month/year) 24/12/1999	Priority date (day/month/year) 06/01/1999	
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC D01B1/42			
Applicant COOPERATIEVE VERKOOP EN PRODUCTIEVERENIGING..et al			
<p>1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.</p> <p>2. This REPORT consists of a total of 4 sheets, including this cover sheet.</p> <p><input type="checkbox"/> This report is also accompanied by ANNEXES, i.e. sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).</p> <p>These annexes consist of a total of sheets.</p>			
<p>3. This report contains indications relating to the following items:</p> <ul style="list-style-type: none"> I <input checked="" type="checkbox"/> Basis of the report II <input type="checkbox"/> Priority III <input type="checkbox"/> Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability IV <input type="checkbox"/> Lack of unity of invention V <input checked="" type="checkbox"/> Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement VI <input type="checkbox"/> Certain documents cited VII <input type="checkbox"/> Certain defects in the international application VIII <input checked="" type="checkbox"/> Certain observations on the international application 			
Date of submission of the demand 26/06/2000		Date of completion of this report 08.03.2001	
Name and mailing address of the international preliminary examining authority:  European Patent Office D-80298 Munich Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465		Authorized officer Auer, H Telephone No. +49 89 2399 2054 	

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No. PCT/NL99/00805

1. Basis of the report

1. This report has been drawn on the basis of *(substitute sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to the report since they do not contain amendments (Rules 70.16 and 70.17).):*

Description, pages:

1-37 as originally filed

Claims, No.:

1-21 as originally filed

Drawings, sheets:

1/7-7/7 as originally filed

2. With regard to the **language**, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item.

These elements were available or furnished to this Authority in the following language: , which is:

- ☐ the language of a translation furnished for the purposes of the international search (under Rule 23.1(b)).
- ☐ the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)).
- ☐ the language of a translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).

3. With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:

- ☐ contained in the international application in written form.
- ☐ filed together with the international application in computer readable form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in written form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.
- ☐ The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.
- ☐ The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

4. The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages:
- ☐ the claims, Nos.:

**INTERNATIONAL PRELIMINARY
EXAMINATION REPORT**

International application No. PCT/NL99/00805

☐ the drawings, sheets:

5. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed (Rule 70.2(c)):

(Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report.)

6. Additional observations, if necessary:

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Yes: Claims 1-21
	No: Claims
Inventive step (IS)	Yes: Claims 1-21
	No: Claims
Industrial applicability (IA)	Yes: Claims 1-21
	No: Claims

2. Citations and explanations
see separate sheet

VIII. Certain observations on the international application

The following observations on the clarity of the claims, description, and drawings or on the question whether the claims are fully supported by the description, are made:
see separate sheet

**INTERNATIONAL PRELIMINARY
EXAMINATION REPORT - SEPARATE SHEET**

International application No. PCT/NL99/00805

ad V:

1. Most relevant prior art document is US-A-5464160, which is cited in the description and which discloses a hammermill where relatively dry material is separated into two fractions by neglecting the juice stream.

The problem of the invention is to provide a better method which can access the plant cell with higher efficiency and can make the cytosol fraction more available for recovery.

The solution is given by the combination of features of claim 1, i.e. in particular by separating the material into a fibre fraction and a juice stream.

There is no hint for this solution in US-A-5464160 nor in the other documents cited in the search report which disclose only technological background.

Claim 1 is, therefore, in line with Articles 33(2) and (3) PCT.

2. The subject-matter of the dependent claims contain further embodiments of the invention and is also in combination with the independent claims novel and inventive (Articles 33(2) and (3) PCT).

ad VIII:

3. Claims 9-21 seem to contain a problem of clarity since the subject-matter of these claims is not defined by real features.

20.03.00

PCT

REQUEST

The undersigned requests that the present international application be processed according to the Patent Cooperation Treaty.

For receiving Office use only

International Application No.

PCTAL 99/00805

24 DEC 1999

International Filing Date

(24.12.99)

BUREAU VOOR DE INDUSTRIËLE EIGENDOM
F.C.T. INTERNATIONAL APPLICATION

Name of receiving Office and "PCT International Application"

Applicant's or agent's file reference

(if desired) (12 characters maximum) P10504PC00

Box No. I TITLE OF INVENTION

Separating and recovering components from plants

Box No. II APPLICANT

Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)

Coöperatieve Verkoop- en Productievereniging van Aardappelmeel en
Derivaten AVEBE B.A.
Beneden Oosterdiep 27
9641 JA Veendam
The Netherlands

☐ This person is also inventor.

Telephone No.

Facsimile No.

Teleprinter No.

State (that is, country) of nationality:

NL

State (that is, country) of residence:

NL

This person is applicant
for the purposes of:☐ all designated
States☒ all designated States except
the United States of America☐ the United States
of America only☐ the States indicated in
the Supplemental Box

Box No. III FURTHER APPLICANT(S) AND/OR (FURTHER) INVENTOR(S)

Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)

Hulst, Anne Coenraad
Julianalaan 57
9461 BS Gieten
The Netherlands

This person is:

☐ applicant only☒ applicant and inventor☐ inventor only (If this check-box
is marked, do not fill in below.)

State (that is, country) of nationality:

NL

State (that is, country) of residence:

NL

This person is applicant
for the purposes of:☐ all designated
States☐ all designated States except
the United States of America☒ the United States
of America only☐ the States indicated in
the Supplemental Box☒ Further applicants and/or (further) inventors are indicated on a continuation sheet.

Box No. IV AGENT OR COMMON REPRESENTATIVE; OR ADDRESS FOR CORRESPONDENCE

The person identified below is hereby/has been appointed to act on behalf of the applicant(s) before the competent International Authorities as:

☒ agent☐ common representative

Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country.)

Mr Drs S.U.Ottevangers, c.s.

c/o VEREENIGDE OCTROOIBUREAUX
Nieuwe Parklaan 97
2587 BN The Hague
The Netherlands

Telephone No.

070-4166711

Facsimile No.

070-4166799

Teleprinter No.

☐ Address for correspondence: Mark this check-box where no agent or common representative is/has been appointed and the space above is used instead to indicate a special address to which correspondence should be sent.

Form PCT/RO/101 (first sheet) (July 1998; reprint January 1999)

See Notes to the request form

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

Continuation of Box No. III FURTHER APPLICANTS AND/OR (FURTHER) INVENTORS

If none of the following sub-boxes is used, this sheet should not be included in the request.

Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)

Ketelaars, Jan Josef Maria Hubert
Torckpark 40
6701 ED Wageningen
The Netherlands

This person is:

- ☐ applicant only
☒ applicant and inventor
☐ inventor only (If this check-box is marked, do not fill in below.)

State (that is, country) of nationality:
NL

State (that is, country) of residence:
NL

This person is applicant
for the purposes of:

- ☐ all designated States ☐ all designated States except the United States of America ☒ the United States of America only ☐ the States indicated in the Supplemental Box

Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)

Sanders, Johan Pieter Marinus
Saaksumberg 1
9722 WL Groningen
The Netherlands

This person is:

- ☐ applicant only
☒ applicant and inventor
☐ inventor only (If this check-box is marked, do not fill in below.)

State (that is, country) of nationality:
NL

State (that is, country) of residence:
NL

This person is applicant
for the purposes of:

- ☐ all designated States ☐ all designated States except the United States of America ☒ the United States of America only ☐ the States indicated in the Supplemental Box

Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)

This person is:

- ☐ applicant only
☐ applicant and inventor
☐ inventor only (If this check-box is marked, do not fill in below.)

State (that is, country) of nationality:

State (that is, country) of residence:

This person is applicant
for the purposes of:

- ☐ all designated States ☐ all designated States except the United States of America ☐ the United States of America only ☐ the States indicated in the Supplemental Box

Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)

This person is:

- ☐ applicant only
☐ applicant and inventor
☐ inventor only (If this check-box is marked, do not fill in below.)

State (that is, country) of nationality:

State (that is, country) of residence:

This person is applicant
for the purposes of:

- ☐ all designated States ☐ all designated States except the United States of America ☐ the United States of America only ☐ the States indicated in the Supplemental Box

☐ Further applicants and/or (further) inventors are indicated on another continuation sheet.

Box No.V DESIGNATION NOTES

The following designations are hereby made under Rule 4.9(a) (mark the applicable check-boxes; at least one must be marked):

Regional Patent

- ☒ **AP ARIPO Patent:** GH Ghana, GM Gambia, KE Kenya, LS Lesotho, MW Malawi, SD Sudan, SZ Swaziland, UG Uganda, ZW Zimbabwe, and any other State which is a Contracting State of the Harare Protocol and of the PCT
- ☒ **EA Eurasian Patent:** AM Armenia, AZ Azerbaijan, BY Belarus, KG Kyrgyzstan, KZ Kazakhstan, MD Republic of Moldova, RU Russian Federation, TJ Tajikistan, TM Turkmenistan, and any other State which is a Contracting State of the Eurasian Patent Convention and of the PCT
- ☒ **EP European Patent:** AT Austria, BE Belgium, CH and LI Switzerland and Liechtenstein, CY Cyprus, DE Germany, DK Denmark, ES Spain, FI Finland, FR France, GB United Kingdom, GR Greece, IE Ireland, IT Italy, LU Luxembourg, MC Monaco, NL Netherlands, PT Portugal, SE Sweden, and any other State which is a Contracting State of the European Patent Convention and of the PCT
- ☒ **OA OAPI Patent:** BF Burkina Faso, BJ Benin, CF Central African Republic, CG Congo, CI Côte d'Ivoire, CM Cameroon, GA Gabon, GN Guinea, GW Guinea-Bissau, ML Mali, MR Mauritania, NE Niger, SN Senegal, TD Chad, TG Togo, and any other State which is a member State of OAPI and a Contracting State of the PCT (if other kind of protection or treatment desired, specify on dotted line)

National Patent (if other kind of protection or treatment desired, specify on dotted line):

- | | |
|--|--|
| <input checked="" type="checkbox"/> AL Albania | <input checked="" type="checkbox"/> LS Lesotho |
| <input checked="" type="checkbox"/> AM Armenia | <input checked="" type="checkbox"/> LT Lithuania |
| <input checked="" type="checkbox"/> AT Austria | <input checked="" type="checkbox"/> LU Luxembourg |
| <input checked="" type="checkbox"/> AU Australia | <input checked="" type="checkbox"/> LV Latvia |
| <input checked="" type="checkbox"/> AZ Azerbaijan | <input checked="" type="checkbox"/> MD Republic of Moldova |
| <input checked="" type="checkbox"/> BA Bosnia and Herzegovina | <input checked="" type="checkbox"/> MG Madagascar |
| <input checked="" type="checkbox"/> BB Barbados | <input checked="" type="checkbox"/> MK The former Yugoslav Republic of Macedonia |
| <input checked="" type="checkbox"/> BG Bulgaria | |
| <input checked="" type="checkbox"/> BR Brazil | <input checked="" type="checkbox"/> MN Mongolia |
| <input checked="" type="checkbox"/> BY Belarus | <input checked="" type="checkbox"/> MW Malawi |
| <input checked="" type="checkbox"/> CA Canada | <input checked="" type="checkbox"/> MX Mexico |
| <input checked="" type="checkbox"/> CH and LI Switzerland and Liechtenstein | <input checked="" type="checkbox"/> NO Norway |
| <input checked="" type="checkbox"/> CN China | <input checked="" type="checkbox"/> NZ New Zealand |
| <input checked="" type="checkbox"/> CU Cuba | <input checked="" type="checkbox"/> PL Poland |
| <input checked="" type="checkbox"/> CZ Czech Republic | <input checked="" type="checkbox"/> PT Portugal |
| <input checked="" type="checkbox"/> DE Germany | <input checked="" type="checkbox"/> RO Romania |
| <input checked="" type="checkbox"/> DK Denmark | <input checked="" type="checkbox"/> RU Russian Federation |
| <input checked="" type="checkbox"/> EE Estonia | <input checked="" type="checkbox"/> SD Sudan |
| <input checked="" type="checkbox"/> ES Spain | <input checked="" type="checkbox"/> SE Sweden |
| <input checked="" type="checkbox"/> FI Finland | <input checked="" type="checkbox"/> SG Singapore |
| <input checked="" type="checkbox"/> GB United Kingdom | <input checked="" type="checkbox"/> SI Slovenia |
| <input checked="" type="checkbox"/> GD Grenada | <input checked="" type="checkbox"/> SK Slovakia |
| <input checked="" type="checkbox"/> GE Georgia | <input checked="" type="checkbox"/> SL Sierra Leone |
| <input checked="" type="checkbox"/> GH Ghana | <input checked="" type="checkbox"/> TJ Tajikistan |
| <input checked="" type="checkbox"/> GM Gambia | <input checked="" type="checkbox"/> TM Turkmenistan |
| <input checked="" type="checkbox"/> HR Croatia | <input checked="" type="checkbox"/> TR Turkey |
| <input checked="" type="checkbox"/> HU Hungary | <input checked="" type="checkbox"/> TT Trinidad and Tobago |
| <input checked="" type="checkbox"/> ID Indonesia | <input checked="" type="checkbox"/> UA Ukraine |
| <input checked="" type="checkbox"/> IL Israel | <input checked="" type="checkbox"/> UG Uganda |
| <input checked="" type="checkbox"/> IN India | <input checked="" type="checkbox"/> US United States of America |
| <input checked="" type="checkbox"/> IS Iceland | |
| <input checked="" type="checkbox"/> JP Japan | <input checked="" type="checkbox"/> UZ Uzbekistan |
| <input checked="" type="checkbox"/> KE Kenya | <input checked="" type="checkbox"/> VN Viet Nam |
| <input checked="" type="checkbox"/> KG Kyrgyzstan | <input checked="" type="checkbox"/> YU Yugoslavia |
| <input checked="" type="checkbox"/> KP Democratic People's Republic of Korea | <input checked="" type="checkbox"/> ZW Zimbabwe |
| <input checked="" type="checkbox"/> KR Republic of Korea | |
| <input checked="" type="checkbox"/> KZ Kazakhstan | |
| <input checked="" type="checkbox"/> LC Saint Lucia | <input checked="" type="checkbox"/> TZ United Republic of Tanzania |
| <input checked="" type="checkbox"/> LK Sri Lanka | <input checked="" type="checkbox"/> CR Costa Rica |
| <input checked="" type="checkbox"/> LR Liberia | <input checked="" type="checkbox"/> DM Dominica <input checked="" type="checkbox"/> MA Morocco |

Check-boxes reserved for designating States (for the purposes of a national patent) which have become party to the PCT after issuance of this sheet:

Precautionary Designation Statement: In addition to the designations made above, the applicant also makes under Rule 4.9(b) all other designations which would be permitted under the PCT except any designation(s) indicated in the Supplemental Box as being excluded from the scope of this statement. The applicant declares that those additional designations are subject to confirmation and that any designation which is not confirmed before the expiration of 15 months from the priority date is to be regarded as withdrawn by the applicant at the expiration of that time limit. (Confirmation of a designation consists of the filing of a notice specifying that designation and the payment of the designation and confirmation fees. Confirmation must reach the receiving Office within the 15-month time limit.)

Box No. VI PRIORITY CLAIM		<input type="checkbox"/> Further priority claims are indicated in the Supplemental Box.		
Filing date of earlier application (day/month/year)	Number of earlier application	Where earlier application is:		
		national application: country	regional application: regional Office	international application: receiving Office
item (1) 6 January 1999	1010976	NL		
item (2)				
item (3)				

☐ The receiving Office is requested to prepare and transmit to the International Bureau a certified copy of the earlier application(s) (only if the earlier application was filed with the Office which for the purposes of the present international application is the receiving Office) identified above as item(s)

* Where the earlier application is an ARIPO application, it is mandatory to indicate in the Supplemental Box at least one country party to the Paris Convention for the Protection of Industrial Property for which that earlier application was filed (Rule 4.10(b)(ii)). See Supplemental Box.

Box No. VII INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

Choice of International Searching Authority (ISA)
(if two or more International Searching Authorities are competent to carry out the international search, indicate the Authority chosen; the two-letter code may be used):

ISA / EP

Request to use results of earlier search; reference to that search (if an earlier search has been carried out by or requested from the International Searching Authority):

Date (day/month/year)

Number

Country (or regional Office)

28 September 1999

SN 32747 NL

NL

Box No. VIII CHECK LIST; LANGUAGE OF FILING

This international application contains the following number of sheets:

request : 4

description (excluding sequence listing part) : 45

claims : 2

abstract : 1

drawings : 7

sequence listing part of description :

Total number of sheets : 59

This international application is accompanied by the item(s) marked below:

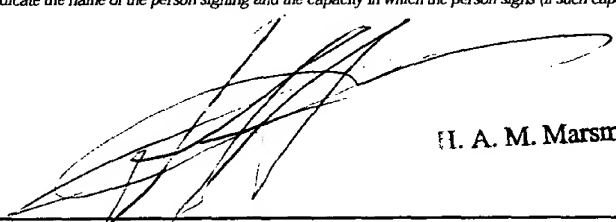
- ☒ fee calculation sheet
- ☐ separate signed power of attorney
- ☐ copy of general power of attorney; reference number, if any:
- ☐ statement explaining lack of signature
- ☐ priority document(s) identified in Box No. VI as item(s):
- ☐ translation of international application into (language):
- ☐ separate indications concerning deposited microorganism or other biological material
- ☐ nucleotide and/or amino acid sequence listing in computer readable form
- ☐ other (specify):

Figure of the drawings which should accompany the abstract:

Language of filing of the international application: English

Box No. IX SIGNATURE OF APPLICANT OR AGENT

Next to each signature, indicate the name of the person signing and the capacity in which the person signs (if such capacity is not obvious from reading the request).


H. A. M. Marsman

For receiving Office use only		2. Drawings: <input checked="" type="checkbox"/> received: <input type="checkbox"/> not received:
1. Date of actual receipt of the purported international application:	24.12.99 24 DEC 1999	
3. Corrected date of actual receipt due to later but timely received papers or drawings completing the purported international application:		
4. Date of timely receipt of the required corrections under PCT Article 11(2):		
5. International Searching Authority (if two or more are competent): ISA /	6. <input type="checkbox"/> Transmittal of search copy delayed until search fee is paid.	

For International Bureau use only	
Date of receipt of the record copy by the International Bureau:	27 JANUARY 2000 (27.01.00)

20.03.00

1/7

INL 99/00805

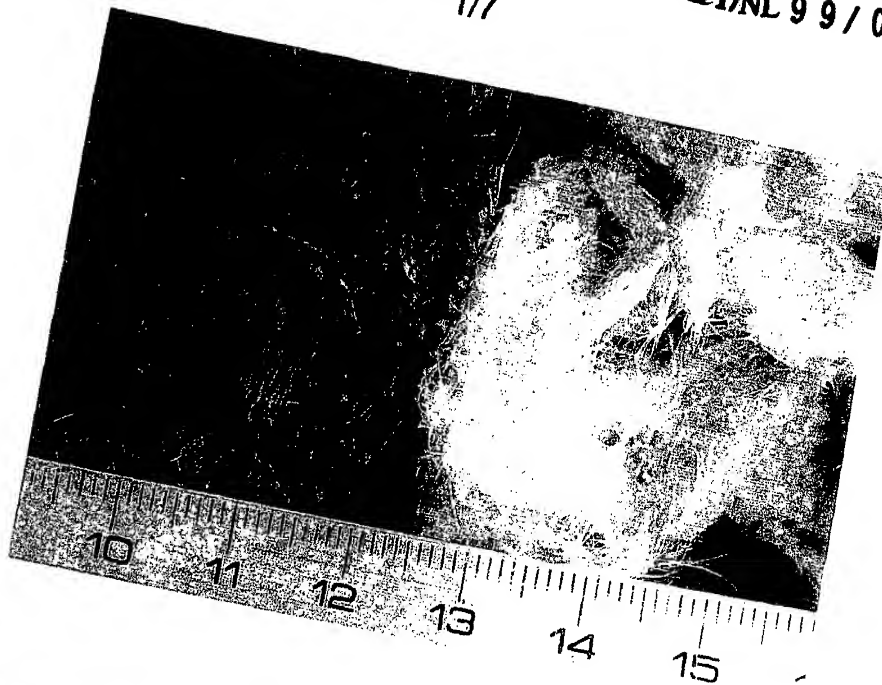
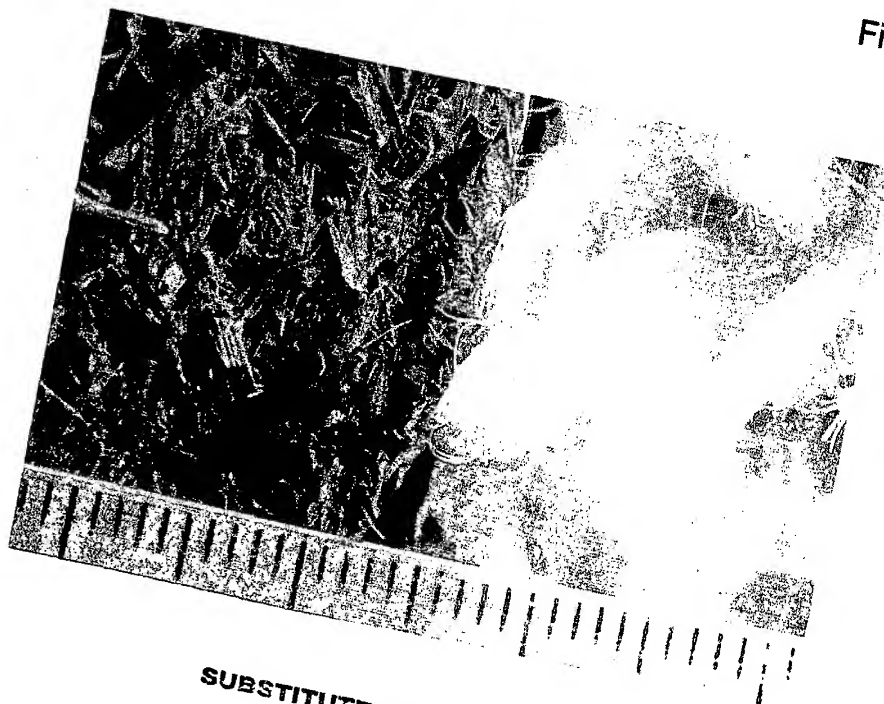


Fig. 1



SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

Fig. 2

2/7

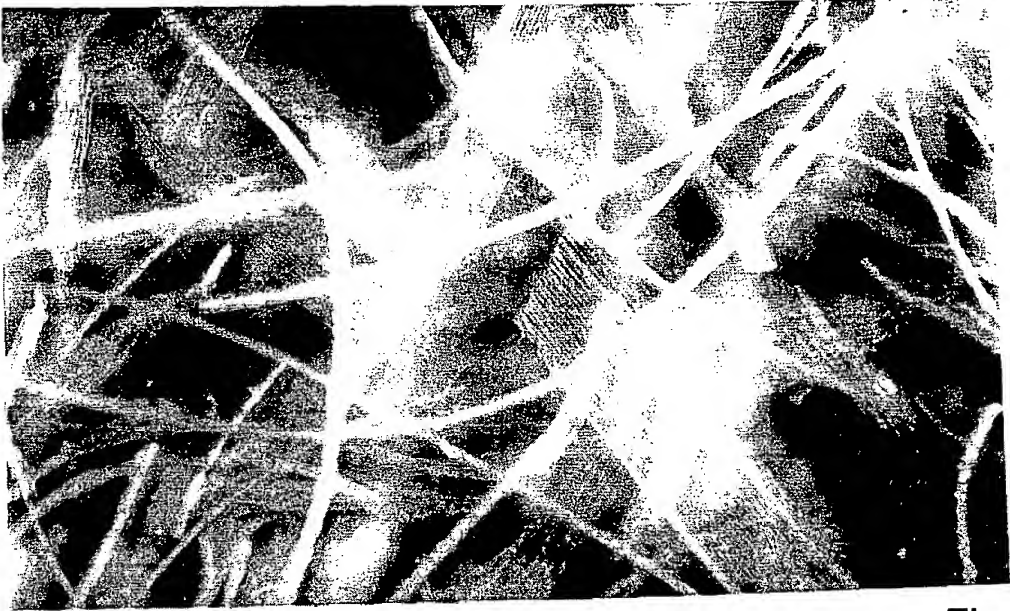


Fig. 3

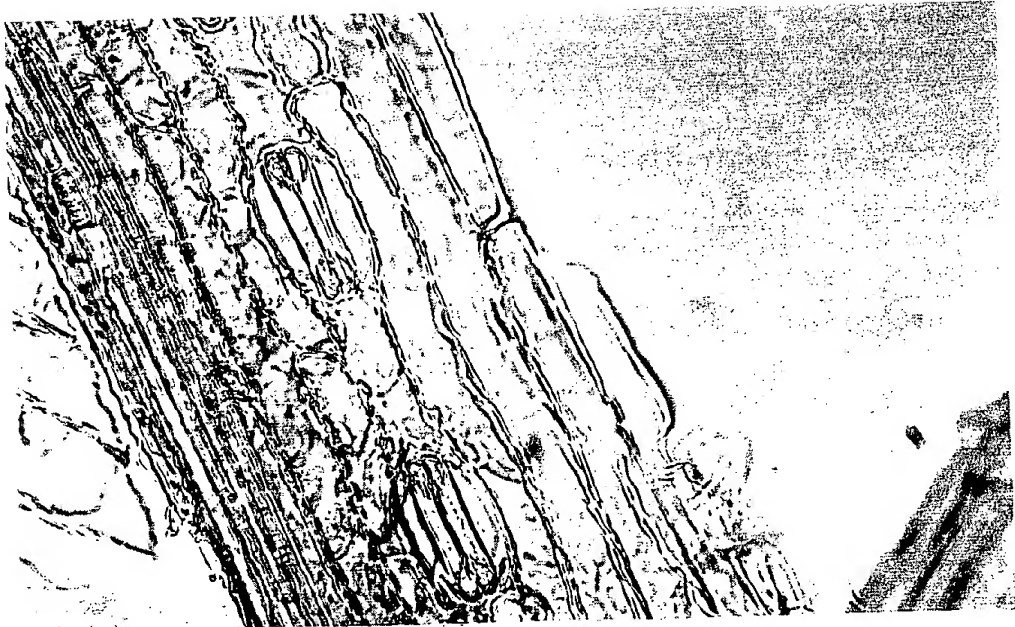


Fig. 4

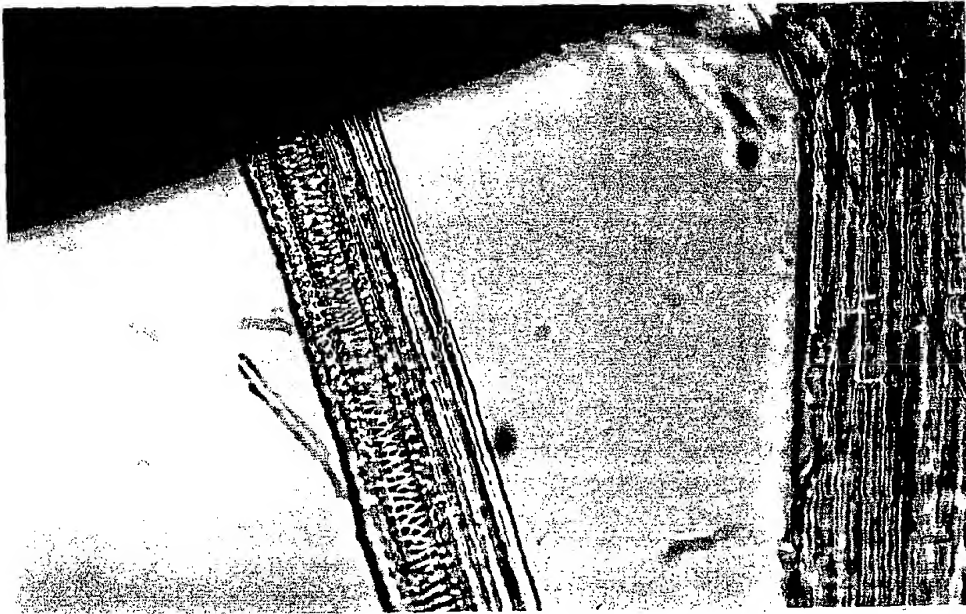


Fig. 5

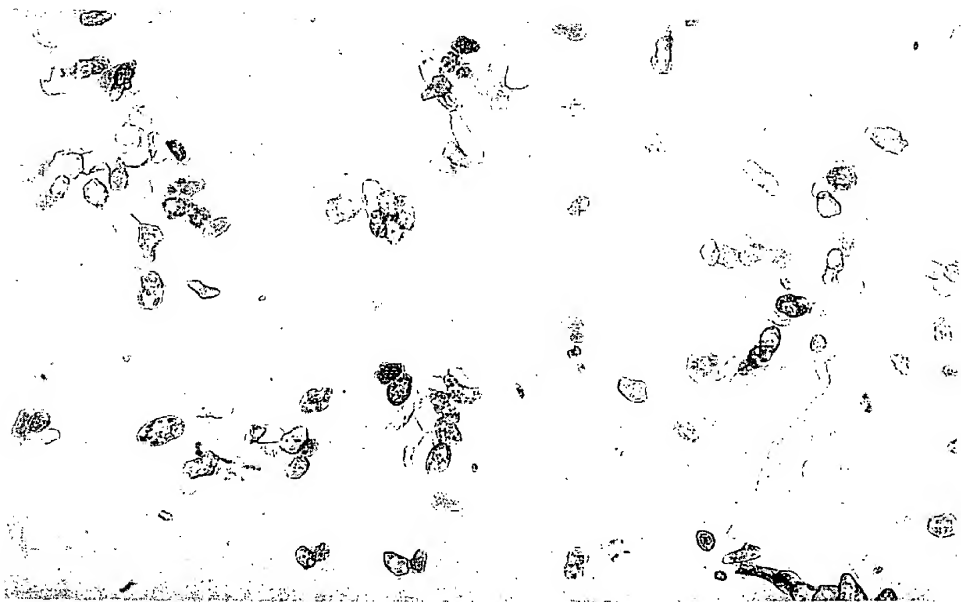


Fig. 6

2 0. 03. 00

4/7

PCT/NL 99/00805

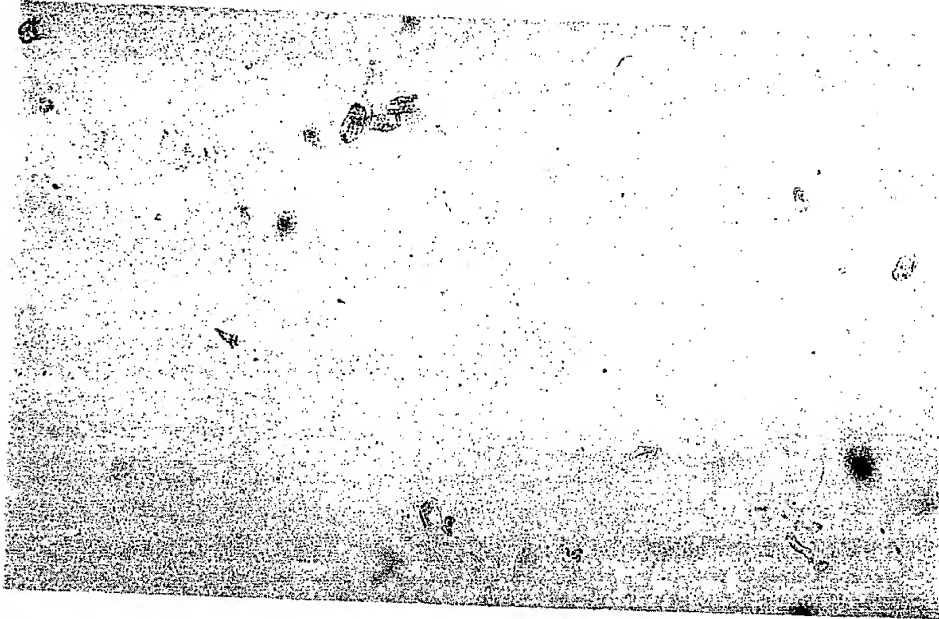


Fig. 7

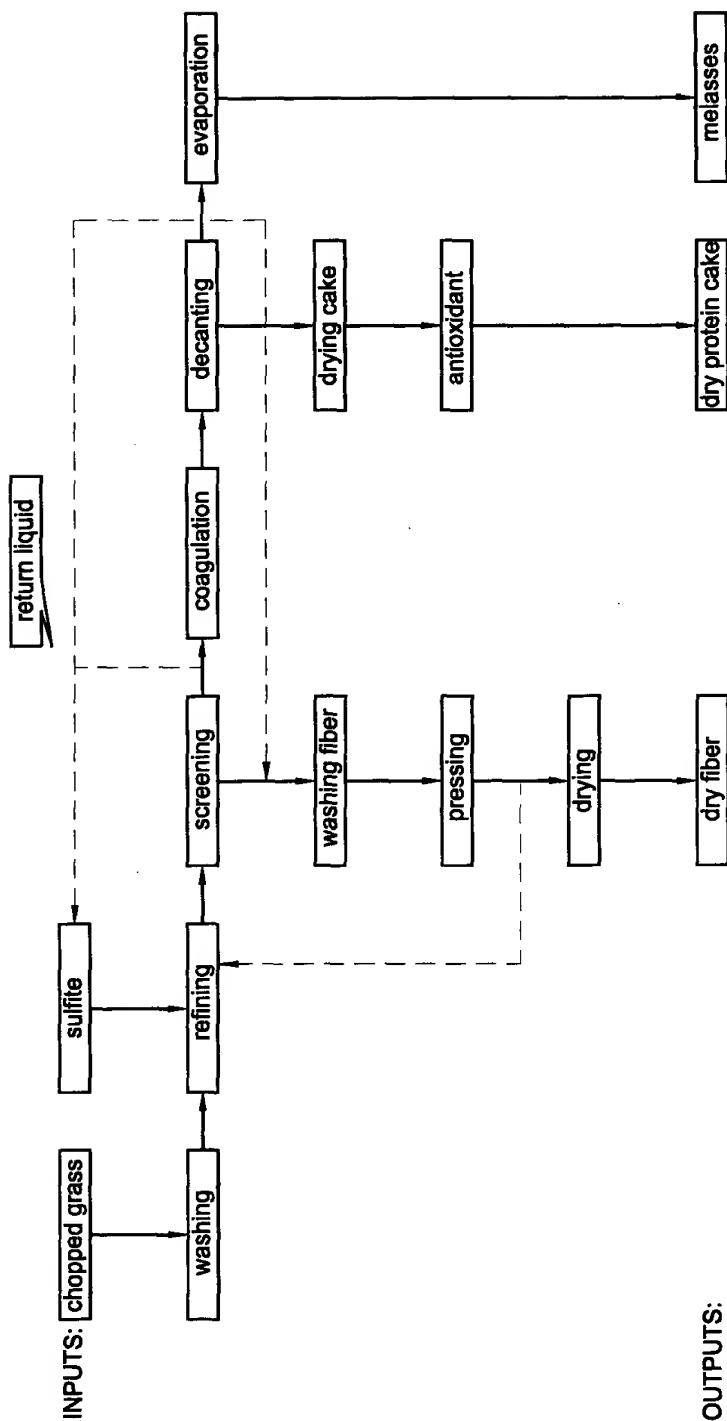


Fig. 8

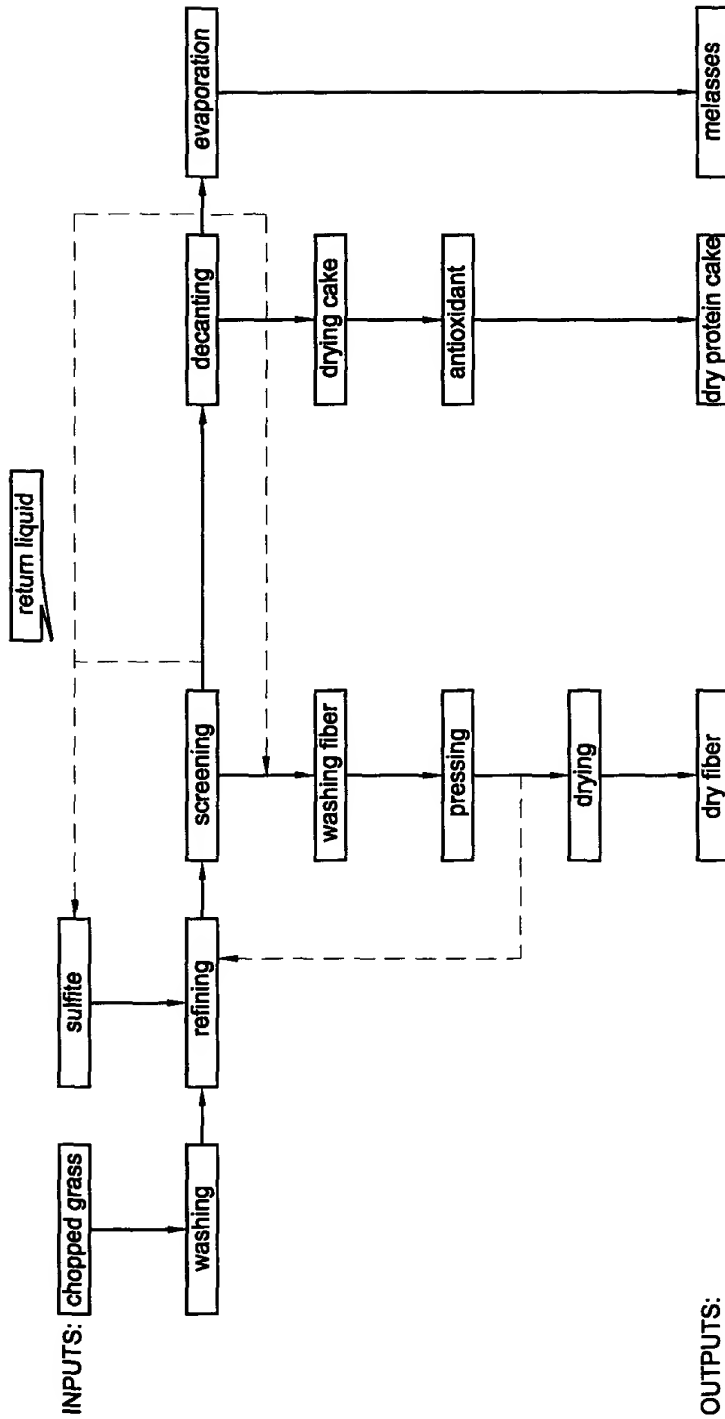


Fig. 9

P10504PC00

Titel: Het scheiden en winnen van componenten uit planten.

De uitvinding heeft betrekking op het scheiden en winnen van componenten uit planten.

Planten zijn, zoals de meeste organismen, opgebouwd uit cellen. Een plantencel bestaat uit een lipiden
5 membraan met een in het algemeen waterige inhoud, het cytosol, waarin de diverse celorganellen (eveneens omgeven door lipide membranen), zoals kern, mitochondriën, endoplasmatisch reticulum en chloroplasten, en het cytoskelet, opgebouwd uit
10 microfilamenten en microtubuli, dat de cel een innerlijke structuur geeft. Tevens zijn in de plantencel vacuolen aanwezig die een belangrijke rol spelen bij het op spanning houden van een plantencel, de vacuolen handhaven de turgor van de cel.

15 De samenstellende componenten van een plantencel zijn ruwweg te onderscheiden in water, wat ruimschoots het grootste deel uitmaakt van een levende cel, componenten zoals zouten, (precursors van) lipiden, koolhydraten, aminozuren en nucleotiden, macromoleculen
20 zoals zetmelen, eiwitten en nucleïnezuur en een veelvoud aan andere moleculen, waaronder vitaminen en kleurstoffen zoals chlorofyl, caroteen en xanthofyl.

Een plantencel is in het algemeen omgeven door een celwand welke stevigheid en structuur geeft aan het
25 plantenweefsel. De celwand is voornamelijk opgebouwd uit (hemi)cellulose en andere koolhydraat-polymeren, welke zijn geaggregeerd tot vezelbundels. Houtige planten bevatten ook in ruime mate lignine, een polymeer samengesteld uit phenolen en andere aromatische
30 monomeren.

Plantenweefsel is samengesteld uit plantencellen welke alle, wanneer levend, in principe aan de bovenstaande omschrijving voldoen. Een belangrijk onderscheid kan worden gemaakt tussen relatief stevige weefsels welke vrijwel geen, en de relatief zachte weefsels welke in het algemeen wel chloroplast of andere plastiden bevattende cellen omvatten. Weefsels welke in het algemeen geen chloroplast houdende cellen omvatten zijn bijvoorbeeld de epidermis of huidweefsel van een plant, het kollenchym en sclerenchym of steunweefsel van een plant en de vaatvezelbundels of het vaatbundelweefsel, omvattende de belangrijke transportvaten (houtvaten en zeefvaten) in de plant. Wanneer een deel van een plant sterk verhout is sterft in het algemeen op den duur het merendeel van de cellen in het verhoude deel af en blijven slechts restanten van de cel inhoud over. Met name de cytosol en de daarin aanwezige organellen gaan verloren maar de vaatvezelbundels, huid en steunweefsels geven in het algemeen vorm en structuur aan de plant en blijven in het algemeen aanwezig als de plant dood is. Kenmerkend is dat deze relatief stevige weefsels (met name vaatbundels, sclerenchym en epidermis) geen tot vrijwel geen chloroplast houdende cellen omvatten, terwijl een belangrijk deel (tenminste in de bovengrondse blad en stengeldelen van de plant) van de relatief zachte weefsels, ook wel chlorenchym genoemd, uit voornamelijk alleen chloroplasthoudende parenchymale cellen is opgebouwd; hier vindt dan ook de fotosynthese plaats. Niet chloroplast houdend parenchym (zoals bijvoorbeeld kan worden gevonden in vruchten, zaden, wortels en knollen van de plant, maar ook in ondergrondse blad en/of stengeldelen) is voornamelijk betrokken bij de opslag van nutriënten, water of gassen. Dergelijke opslag geschiedt met name in celorganellen verwant aan de chloroplasten, in het algemeen (pro)plastiden genoemd, zoals in

amyloplasten (opslag en productie van koolhydraten)
elaioplasten (lipiden) en chromoplasten (kleurstoffen).

Genetische manipulatie of modificatie van planten is het veranderen van overdraagbare eigenschappen of kenmerken van een plant middels moderne recombinante of biotechnologische technieken. De techniek van genetische manipulatie is halverwege de jaren 80 op experimenteel niveau ontwikkeld bij planten. Aan het begin van de jaren 90 leidde dit tot de eerste handelsklare producten. Op dit moment wordt de techniek voornamelijk toegepast op bacteriën, schimmels en planten. Er bestaan echter ook mogelijkheden bij dieren. De technieken bij dieren zijn op dit moment nog niet optimaal of niet rendabel, en brengen voor de hoger ontwikkelde dieren op ethisch vlak problemen met zich mee.

Overdraagbare eigenschappen zijn min-of-meer eenvoudige eigenschappen, door een gen gecodeerd voor een bepaalde locus. Een genetisch gemodificeerde plant (of transgene plant) is een levend organisme waarnaar door middel van genetische-manipulatietechnieken (DNA recombinitie) een gen met bepaalde eigenschappen, dat in een donororganisme is geïdentificeerd, wordt overgebracht. Ook is het mogelijk een plant zodanig genetisch te modificeren dat deze een bepaald, van oudsher in die plant aanwezig gen, niet meer kan activeren of tot expressie brengen, het betreffende gen is dan uitgeschakeld. De transgene of gemodificeerde plant komt door het overgedragen of uitgeschakelde gen in het bezit van een nieuwe eigenschap of ander kenmerk, op hun beurt overdraagbaar op het nageslacht. Het overdragen of uitschakelen van genen kan worden uitgevoerd door het gebruik van bijvoorbeeld een bacterie als *Agrobacterium tumefaciens*, die door middel van plasmiden genetisch materiaal over kan dragen op een plantencel. De genen worden vervolgens opgenomen in het genoom van de geïnfecteerde cel. Er kan ook gekozen worden voor andere

manieren van modificatie, zoals het bombarderen van een plantencel met kogeltjes die omwikkeld zijn met DNA-fragmenten waarin het over te dragen gen zich bevindt.

De toepassing van de moderne biotechnologie in de
5 landbouw biedt nieuwe mogelijkheden waarbij op het eerste gezicht bepaalde opbrengsten gegarandeerd zijn en minder fytosanitaire producten ingezet moeten worden in de strijd tegen plagen en ziekten, en tevens kwalitatief
10 hoogstaande producten verkregen worden. Schattingen uit 1998 tonen aan dat wereldwijd op een oppervlakte van 30 miljoen hectare transgene planten worden verbouwd (tegen 14 miljoen hectare in 1997). Dit gebeurt voornamelijk in de Verenigde Staten (88%), Zuid-Amerika (katoen in Argentinië) (6%) en Japan (6%). Cijfers over de met
15 transgene gewassen bebouwde oppervlakte in China zijn niet bekend, maar het gaat waarschijnlijk om een aanzienlijk percentage.

Naast de door genetische manipulatie verbeterde variëteiten die momenteel op de markt zijn - een
20 twaalfstal voedings- en non-foodgewassen - is er snelle en reusachtige vooruitgang te verwachten in het onderzoek op dit gebied, ook al bevindt het merendeel van de toepassingen zich nu nog in een experimenteel stadium. Mogelijke verbeteringen zijn van zeer groot belang, met
25 name bij de teelt van voedingsgewassen. Bovendien moet worden gewezen op de te verwachten ontwikkeling van genetisch gemodificeerde planten voor producten in de non-foodsector, die een zeer interessante bron van diversifiëring voor de landbouw vormen.

30 In principe zijn een tweetal typen genetische modificaties denkbaar. Een eerste type behelst het introduceren van nieuwe eigenschappen of kenmerken welke bevorderlijk of behulpzaam zijn voor de teelt of kweek van het betreffende gewas. Te denken valt aan het
35 introduceren van droogte of koude resistentie zodat het gewas ook in andere gebieden dan waar het oorspronkelijk

gedijde geteeld kan worden. Ook het introduceren van resistentie of tolerantie tegen herbiciden, zodat de onkruidbestrijding rond het gewas uitgevoerd kan worden met het betreffende herbicide zonder dat het

5 gemodificeerde of recombinante gewas daar noemenswaardige schade van ondervindt, of het introduceren van resistentie tegen ziekten of plagen, behelst het introduceren van nieuwe eigenschappen of kenmerken welke bevorderlijk of behulpzaam zijn voor de teelt of kweek
10 van het betreffende gewas.

Een tweede type behelst het introduceren of uitschakelen van genen waardoor het betreffende gewas een in potentie hoogwaardiger (recombinant) eindproduct kan leveren. Te denken valt hierbij bijvoorbeeld aan
15 smaakverbetering of betere houdbaarheid van producten. Echter, een belangrijkere toepassing is het verhogen of verrijken van de plant met waardevolle componenten of inhoudsstoffen. Verhoging van het vitamine gehalte van een plant middels genetische modificatie; verhoging en of
20 verrijking van het eiwit of aminozuur gehalte, waarbij hoogwaardige eiwitten of aminozuren preferentieel door de plant worden geproduceerd middels genetische modificatie; het verbeteren van het evenwicht tussen verzadigde en onverzadigde vetzuren middels genetische modificatie zijn
25 allen voorbeelden van in het verschiets liggende mogelijkheden van genetische modificatie bij planten.

Ook zijn nieuwe productiemogelijkheden voor zeer specifieke samenstellingen reeds voorzien. Met name de productie van vaccins (gebaseerd op planten die
30 recombinante eiwitten of peptiden tot expressie brengen), van antibiotica (gebaseerd op planten welke voorzien zijn van recombinante enzymen of enzym systemen die deze antibiotica kunnen produceren), en van andere voor de humane of diergeneeskunde belangrijke factoren
35 (hemoglobine, insuline, stollingsfactoren, groeihormoon, humane of dierlijke (verterings)enzymen, en wat dies meer

zij) zijn toepassingen van het introduceren of uitschakelen van genen waardoor het betreffende gewas een in potentie hoogwaardiger (recombinant) eindproduct kan leveren.

5 De huidige toepassingen van het introduceren van nieuwe eigenschappen of kenmerken welke bevorderlijk of behulpzaam zijn voor de teelt of kweek van het betreffende gewas, zoals op het terrein van de tolerantie tegen herbiciden, zijn het verst gevorderd. Ze zijn
10 veelbelovend voor de landbouwproductie, de beheersing van de productiekosten en ten aanzien van de gevolgen van de landbouwactiviteit voor het milieu. Door middel van transgenese verkregen resistentie van planten tegen ziekten biedt duidelijke voordelen voor de teelt of kweek
15 van de betreffende plant: er bestaan met name zeer weinig of in sommige gevallen zelfs geen conventionele middelen ter bestrijding van bacteriën en virussen. Bij inherente resistentie van een plant kunnen behandelingen in bijna alle gevallen achterwege blijven, en het effect op de
20 opbrengst ligt dan beduidend hoger dan bij behandeling.

Echter, in het geval van het introduceren of uitschakelen van genen waardoor het betreffende gewas een in potentie hoogwaardiger (recombinant) eindproduct kan leveren zijn ook nog problemen van een andere orde te
25 overwinnen. Essentiële vragen met betrekking tot de winbaarheid van het gewenste product zijn bijvoorbeeld: hoe wordt het hoogwaardige product gewonnen, hoe scheidt ik de hoogwaardige (recombinante) component van het andere plantaardig materiaal, moet de te winnen component
30 in bepaalde, gemakkelijk te oogsten delen (zaden, vruchten, knollen etc), van de plant aanwezig zijn (waarbij hoge eisen worden gesteld aan de aard van de genetische modificatie, er moet niet alleen een gen gemodificeerd zijn dat het betreffende product codeert,
35 dit gen moet ook nog op de juiste plaats tot expressie

worden gebracht) of moet de betreffende component uit alle delen van de plant worden gewonnen?

Met name voor eiwitproducten, voor relatief laagwaardige producten, voor producten welke in een
5 relatief lage concentratie in de plant aanwezig zijn, en voor producten welke evenredig door de plant verdeeld zijn hebben de bestaande winningstechnologieën geen duidelijke antwoorden. Het is sinds lang bekend diverse componenten uit plantaardige grondstoffen te winnen voor
10 verder gebruik in bijvoorbeeld voedsel voor menselijke of dierlijke consumptie middels mechanische methoden. Vaak worden planten slechts verkleind of verhakseld om ze geschikt te maken voor consumptie, een voorbeeld is het hakselen van mais voor veevoer. Het is duidelijk dat
15 hakselen echter niet bijdraagt aan een betere winning van een recombinante component welke relatief zuiver verkregen dient te worden.

Met name de in de plantencel in het cytosol aanwezige componenten zijn bij uitstek geschikt voor
20 menselijke of dierlijke voeding aangezien deze bouwstoffen kunnen zijn voor overeenkomende componenten welke in dierlijke cellen aangetroffen worden. Daarom worden met name specifieke delen van een plant, zoals zaden, knollen, wortels of vruchten welke specifiek rijk
25 zijn aan bijvoorbeeld sap, suikers, eiwit, olie of zetmeel ook wel onderworpen aan verdergaande winningsmethoden, zoals persen of malen. Voorbeelden zijn het persen van olie uit olijven of oliehoudende zaden, het winnen van eiwit uit sojabonen of het vermalen van
30 aardappels of graankorrels tot meel. Een ander bekend voorbeeld is het persen van sap uit vruchten zoals druiven, voor directe consumptie of voor verdere verwerking. Bij druivensap gaat het voornamelijk om het water, de suikers en de kleur- en smaakstoffen en om de
35 verdere omzetting tot wijn.

Een voorbeeld van een winning van een plantaardige
gronstof waar geen persmethode wordt toegepast is de
winning van suiker uit bijvoorbeeld suikerbieten. Bieten
worden in het algemeen versneden tot smalle reepjes (ook
5 wel cossettes of frietjes genoemd) waarna de cossettes in
een diffusietoren met heet water worden doorgespoeld.
Gedurende dit diffusieproces diffundeert de suiker uit de
bieten cellen. De suiker komt relatief eenvoudig vrij uit
reeds beschadigde cellen, maar moet middels osmose en/of
10 dialyse vrijkomen uit de intacte bietencel, waarvan er
natuurlijk veel meer aanwezig zijn. Deze osmose en
dialyse kan alleen renderend geschieden wanneer de
temperatuur gedurende het hele proces nauwkeurig wordt
gereguleerd, op bijvoorbeeld 72° C, en bij gebruik van
15 voldoende grote hoeveelheden water. Er kan worden gesteld
dat per ton suikerbiet minstens 1100 liter water nodig
is. Middels een tegenstroom principe wordt het
suikerrijke water gescheiden van de natte cossettes (nu
pulp geheten). De natte pulp wordt gedroogd, en het
20 suikerwater wordt (eventueel na filtratie, carbonatie en
andere voorbehandelingen) ingedampt. Het drogen van de
pulp en het indampen van het suikerrijke water tot
diksap, ook wel serum geheten, vraagt veel energie.

Mechanische verwerking wordt van oudsher ook
25 toegepast op voedergewassen, zoals gras, lucerne en
andere vers en groen geoogste planten welke vaak als
vrijwel gehele plant, en met name de blad- en/of
stengeldelen en meestal behoudens de wortels, worden
gebruikt voor het winnen van bijvoorbeeld
30 (dier)voedselcomponenten. Dergelijke plantaardige
grondstoffen worden in het algemeen middels persen van
(bijvoorbeeld gehakseld of anderszins verkleind) blad
en/of stengel materiaal gewonnen, waarbij een deel van
het plantaardig materiaal als perssap verkregen wordt
35 terwijl het overblijvende en geperste materiaal als
perskoek bekend staat. Deze technieken staan ook tot de

beschikking wanneer het materiaal van genetisch gemodificeerde planten afkomstig zou zijn.

Echter, de door het persen uitgeoefende drukkrachten resulteren in het algemeen in het slechts gedeeltelijk
5 ontsluiten (knappen of barsten) van plantencellen in het materiaal, waardoor slechts een gedeelte van de waterige maar voedselcomponentrijke cytosol, eventueel met resten van de organellen en het de cel omgevende lipiden membraan, als perssap uit de cel vrijkomt. Het rendement
10 van een dergelijke methode is dus laag. Perssap wordt in het algemeen verder behandeld, bijvoorbeeld middels zeven, waarna bijvoorbeeld het eiwit in het sap gewonnen wordt middels coagulatie door bijvoorbeeld zuur- en/of hitte-behandeling. Ook kan perssap verder worden bewerkt
15 middels (ultra- of membraan)filtratie, drogen, fermentatie of andere aan de vakman bekende methoden. Eiwitrijke of anderszins hoogwaardige voedingsstoffen voor menselijke en dierlijke consumptie, maar ook kleurstoffen zoals caroteen (pro-vitamine A), kunnen op
20 deze manier slechts met laag rendement uit cytosol worden gewonnen.

De resulterende, relatief droge perskoek wordt in het algemeen als minder voedselrijk beschouwd, deze bevat
relatief intacte vezelbundels samengesteld uit (niet
25 direkt) verteerbare cellulose vezels, aanhangend perssap en resterende plantencellen welke niet onder invloed van het persen zijn ontsloten. Vooral deze resterende plantencellen met niet gewonnen cytosol geven nog voederwaarde aan de perskoek, die in het algemeen wordt
30 gedroogd en, al dan niet gepelleteerd, gebruikt als (ruwvoer) component in diervoeders, met name voor herkauwers.

Voor het mechanisch omsluiten van bijvoorbeeld grassen wordt traditioneel een werkwijze toegepast
35 gebaseerd op het desintegreren van de plantaardige grondstof met behulp van hamermolens gevolgd door het

uitpersen van de gedesintegreerde grondstof (hier aangeduid als pulp) met behulp van schroefpersen of bandpersen. Hierbij wordt de pulp gescheiden in een fractie perskoek en een fractie perssap. De sapfractie
5 wordt beschouwd als de fractie waarin zich de industrieel winbare inhoudstoffen uit het plantenmateriaal bevinden. Hamermolens bestaan in de regel uit een rotor waaraan zich vaste of vrij beweeglijke elementen bevinden die bij het ronddraaien van de rotor in contact worden gebracht
10 met de plantaardige grondstof en deze middels slagkracht desintegreren. Het desintegrerende effect van hamermolens is relatief groot wanneer het plantaardige materiaal een goede turgor bezit, d.w.z. wanneer de plantencellen onder druk staan. In dat geval zorgt de slagkracht ervoor dat
15 het weefsel kapot springt en de celinhoudbestanddelen met het weefselvocht vrijgemaakt worden. Is de turgor gering dan zal het plantenmateriaal door er op te slaan ingedrukt worden. Het weefsel blijft daarbij min of meer intact en het resultaat is dat de celinhoud in veel
20 mindere mate beschikbaar komt. Dit heeft grote gevolgen voor de winbaarheid van met name die celinhoudbestanddelen die slechts ten dele in opgeloste vorm in de plantaardige biomassa aanwezig zijn en voor een ander deel in de vorm van vaste, onopgeloste stof.
25 Dit geldt o.a. voor plantaardige eiwitten, maar ook voor lipiden en pigmenten, en het valt te begrijpen dat dit voor recombinante producten niet anders zal zijn. Ook zijn hamermolens bekend (bijvoorbeeld uit US 5.464.160) waar relatief droog materiaal in twee fracties gescheiden
30 wordt, dit met veronachtzaming van de zo waardevolle sapstroom met eiwitrijk cytosol.

Bij de boven beschreven persmethodes van plantaardig materiaal bevat is het in het algemeen van belang dat het materiaal zo vers mogelijk, kort na de oogst, wordt
35 bewerkt. Alleen dan staan de plantencellen voldoende onder spanning om onder druk te kunnen barsten of knappen

zodat de cytosol vrijkomt. Plantendelen welke op het moment van persen al enige tijd geleden zijn geoogst zijn al enigszins uitgedroogd, de aanwezige plantencellen hebben een groot deel van de noodzakelijke turgor verloren en zijn te slap om nog onder druk te kunnen barsten of knappen. In niet vers materiaal zal de winning van perssap dus met nog minder rendement verlopen. Hetzelfde geldt voor materiaal afkomstig van planten die al voordat zij werden geoogst een groot deel van de turgor in hun planten cellen hebben verloren door uitdroging en/of rijping. In het algemeen zijn dergelijke planten niet meer (volledig) groen maar krijgen zij bruine of gele aspecten. Verhoute plantendelen komen in het geheel niet in aanmerking voor bovenstaande methoden aangezien hierin de meeste cellen afgestorven zijn, of in ieder geval een slechts zeer geringe cytosol fractie bevatten en dus geen bijdrage leveren aan de winning van hoogwaardig voedsel.

In het algemeen wordt plantenmateriaal gescheiden in een (pers)koek- (pulp) en een (pers)sap-fractie (diksap). Kenmerk van deze werkwijze is de slechts gedeeltelijke onttrekking (met het perssap) van de celinhoudbestanddelen (vacuole-inhoud en cytoplasma met daarin aanwezige celorganellen zoals chloroplasten en celkernen); de celwanden blijven nagenoeg volledig achter in de perskoek tezamen met het overige deel van de celinhoud. In de perskoek bevinden zich alle weefsels die ook in de grondstof zitten, daarnaast ook een deel van de celinhoud. De kleur van de verse perskoek is overwegend groen of geel doordat de chloroplasten met daarin het aanwezige chlorofyl (bladgroen) met het perssap slechts ten dele verwijderd zijn. Het plantenmateriaal is slechts ten dele tot op weefsel niveau gedesintegreerd; dat betekent dat nog herkenbare fragmenten van bladeren en stengels aanwezig zijn naast individuele weefsels zoals geïsoleerde vaatbundels.

Het perssap bestaat in hoofdzaak uit de waterige inhoud van cellen: de vacuole-inhoud en het cytoplasma met daarin celorganellen zoals chloroplasten in intacte of gedesintegreerde vorm; celwandbestanddelen zijn
5 nagenoeg afwezig doordat ze in de perskoek achterblijven.

De winbaarheid van eiwit en andere gedeeltelijk oplosbare stoffen is daardoor bij de traditionele werkwijze van fractioneren erg gevoelig voor variaties in de aard van de plantaardige biomassa, m.n. de
10 aanwezigheid van turgor die zich in de regel vertaalt in verschillen in drogestofgehalte.

De traditionele werkwijze van fractioneren heeft tot gevolg dat bij uitpersen van de pulp slechts een deel van de celinhoudbestanddelen in de sapstroom terechtkomt en
15 een ander deel achterblijft in de perskoek. De perskoek bevat dus nog, naast het merendeel van de celwanden, ook nog een deel van de celinhoudbestanddelen en wordt daardoor gebruikt als veevoeder.

De bestaande persmethodes om uit plantaardig
20 materiaal hoogwaardige van laagwaardige componenten te scheiden zijn dus relatief sterk afhankelijk van de turgor van de in het plantaardig materiaal aanwezige cellen wat het toepassen van deze methodes beperkt tot het toepassen op relatief vers en groen materiaal. De
25 bestaande methodes zijn dus niet erg geschikt om hoogwaardige componenten met rendement uit genetisch gemodificeerde planten te winnen. De resulterende perskoek bevat, ook met gebruik van vers en/of groen materiaal, vaak nog grote hoeveelheden onontsloten
30 plantencellen met daarin hoogwaardige cytosol terwijl slechts een geringe prijs voor perskoek verkregen zal kunnen worden daar deze eigenlijk alleen geschikt is als relatief laagwaardige component van diervoeder. De
bestaande klassieke werkwijzen zouden in principe ook
35 toepasbaar zijn op genetisch gemodificeerde planten welke specifiek dusdanig zijn gemodificeerd dat juist hun delen

zoals zaden, knollen, wortels of vruchten rijk zijn aan bijvoorbeeld de gewenste recombinante eiwitten, peptiden, aminozuren, oliën en koolhydraten. Echter, traditionele persmethoden, zoals bijvoorbeeld bekend bij grassen, zijn
5 niet in staat tot complete scheiding van sap en vezel fracties. Ook een diffusie proces, zoals beschreven bij de verwerking van suikerbieten, heeft grote nadelen, het vraagt dermate veel water en energie dat het terugwinnen van de gewenste grondstof, zoal dat al mogelijk zou zijn
10 erg duur zou worden. Met name nu genetisch gemodificeerde suikerbieten, en andere knol- en/of wortel planten, als gewas steeds vaker zullen worden geteeld is behoefte aan betere winnings methoden, welke dan ook kunnen worden toegepast bij ongemodificeerde gewassen. Tevens,
15 specifieke lokalisatie van de te winnen component vergt meer dan het modificeren van een gen alleen, het zal dan in de meeste gevallen nodig zijn de plant zodanig te modificeren dat deze het gewenste product niet alleen produceert, maar ook de gemodificeerde systemen bezit om
20 de gewenste producten in die specifieke delen op te slaan. De moleculair biologische kennis van de systemen welke betrokken zijn bij de opslag is vooralsnog in het algemeen niet toereikend om ook de opslag van het product zodanig te manipuleren dat het gewenste resultaat bereikt
25 wordt. Weefsel specifieke expressie van recombinante genen staat nog in de kinderschoenen. In het algemeen kan worden verwacht dat het gewenste product ook, en voornamelijk, te vinden zal zijn in de blad- en/of stengeldelen van de gemodificeerde plant.

30 Voor het winnen van hoogwaardige componenten uit genetisch gemodificeerde en ongemodificeerde planten, zoals bijvoorbeeld uit blad- en/of stengeldelen, wortels of knollen is behoefte aan betere methoden die met een hoger rendement dan de bestaande methoden de plantencel
35 kunnen ontsluiten, de cytosolfractie meer beschikbaar kan maken voor winning en betere afzetmogelijkheden biedt

voor het vezelhoudend restmateriaal. De uitvinding beoogt in deze behoefte te voorzien.

De uitvinding voorziet in een werkwijze voor het
5 scheiden van componenten uit materiaal van een plant met het kenmerk dat het materiaal op zijn minst ten dele vervezeld wordt en vervolgens zodanig wordt gescheiden in een vezelfractie en een sapstroom dat de vezelfractie voornamelijk relatief stevige weefsels zoals epidermis,
10 sclerenchym en vaatbundels omvat en de sapstroom voornamelijk zachte weefsels zoals parenchym en cytosol bevat. In een voorkeursuitvoering voorziet de uitvinding in een methode tot scheiding van een sapstroom die met name chloroplasten omvat, echter, ook dat parenchym dat
15 met name andere plastiden, zoals amyloplasten, elaioplasten en chromoplasten omvat is eenvoudig te scheiden van de vezelfractie. De uitvinding voorziet in een nieuwe werkwijze van fractioneren, die bestaat uit tenminste twee stappen: een eerste stap waarin het
20 plantaardige materiaal door middel van de inwerking van afschuifkrachten vervezeld wordt en een tweede stap waarin de vezelfractie afgescheiden wordt van de rest.

De werkwijze volgens de uitvinding is toepasbaar op alle vezelhoudende plantaardige materialen, zowel
25 afkomstig van geteelde planten (cultuurgewassen) als van wilde planten, als op kruisingsproducten.

Een werkwijze volgens de uitvinding is zowel van toepassing op wel of niet genetisch gemodificeerd plantaardig materiaal dat voornamelijk blad- en/of
30 stengeldelen omvat, zoals plantaardige biomassa afkomstig van cultuurgrasland, voedergewassen zoals voedergrassen en maïs, luzerne, klaver, en andere vlinderbloemigen, vezelgewassen zoals vlas en hennep, en het loof van gewassen welke normaliter alleen voor hun zaden, vruchten
35 of knollen geteeld worden zoals granen, bieten, erwten, bonen, aardappels, wortelen, cassave, bataat. De

werkwijze van de uitvinding is ook van toepassing op het verwerken van conventionele zaden, vruchten of knollen zoals granen, suikerbieten, topinamboer, bieten, erwten, bonen, aardappels, wortelen, cassave, bataat, en op
5 genetisch gemodificeerde planten welke specifiek dusdanig zijn gemodificeerd dat juist hun delen zoals zaden, knollen, wortels of vruchten rijk zijn aan bijvoorbeeld de gewenste recombinante eiwitten, peptiden, aminozuren, oliën en koolhydraten.

10 Fractioneren van plantaardige biomassa betekent het scheiden in een aantal fracties. Door biomassa te fractioneren ontstaan nieuwe productstromen met andere toepassingsmogelijkheden dan de grondstof zelf. Deze nieuwe productstromen vertegenwoordigen daardoor vaak
15 tezamen meer waarde dan de oorspronkelijke biomassa. De uitvinding voorziet in een nieuwe techniek die is gebaseerd op het vervezelen en vervolgens ontvezelen van plantaardige biomassa.

In een voorkeursuitvoering voorziet de uitvinding in
20 een werkwijze tot scheiding van componenten uit plantaardig materiaal met het kenmerk dat het materiaal op zijn minst ten dele mechanisch vervezeld wordt en vervolgens wordt gescheiden in een vezelfractie en een sapstroom, waarbij de vezelfractie (zie bijvoorbeeld
25 figuur 1 en 2, ook voor een vergelijking met een traditionele methode) voornamelijk relatief stevige weefsels zoals epidermis, sclerenchym en vaatbundels omvat en de sapstroom (zie bijvoorbeeld figuur 6 en 7, ook voor een vergelijking met een traditionele methode)
30 voornamelijk zachte weefsels zoals parenchym en cytosol bevat. De mechanische vervezeling wordt bijvoorbeeld bewerkstelligd middels behandeling van het materiaal in een blender. Bij voorkeur, zeker wanneer toepassing op industriële schaal is gewenst, geschiedt de vervezeling
35 volgens de uitvinding middels een inrichting zoals een (druk)refiner, met maalschijven, zoals toegepast in de

pulp- en papierindustrie, of in een inrichting met gelijkwaardige werking waardoor het plantaardig materiaal kan worden vervezeld zodat het kan worden gescheiden in een vezelfractie welke voornamelijk relatief stevige weefsels zoals epidermis, sclerenchym en vaatbundels omvat en de sapstroom voornamelijk zachte weefsels zoals parenchym en cytosol omvat. Bij het vervezelen wordt het vaatbundelweefsel met het sclerenchym en de epidermis (tezamen de vezelfractie) mechanisch losgemaakt van het overige in hoofdzaak parenchymatische weefsel. Dit parenchymatische weefsel wordt tegelijkertijd ontsloten en de celinhoudbestanddelen (cytosol en parenchym) hieruit komen hierbij nagenoeg volledig beschikbaar. Het vervezelen kan gebeuren met behulp van refiners zoals deze in de pulp- en papierindustrie in gebruik zijn voor het vervezelen van hout en houtpulp. Refinen c.q. vervezelen gebeurt in de regel onder toevoeging van vocht aan het plantenmateriaal. Het resultaat is dan een slurrie van vervezeld materiaal waaruit de vezels verwijderd kunnen worden. De vezelfractie (vezelstroom) die aldus gewonnen wordt, is door zijn aard en samenstelling onder andere geschikt voor de volgende toepassingen: als grondstof voor papier en karton (massiefkarton, vouwkarton en vormkarton), als grondstof voor de productie van vezelplaatmaterialen (zachtboard, hardboard, spaanplaat, MDF, HDF en MDF/HDF vormdelen) en composieten, als grondstof voor vochtabsorberende materialen, als luiers, maandverband etc., als grondstof voor de bereiding van groei media (potgrond en substraten), mulchen (als bescherming tegen erosie, en als onkruid- en ziekteonderdrukker), als bodemverbeteraar of als brandstof.

Bij het ontvezelen wordt de vrijgemaakte vezel bijvoorbeeld middels zeven afgescheiden van de overige plantenbestanddelen. Door wassen en zeven kan de vezel verder gezuiverd worden en kunnen zoveel mogelijk niet-

vezelbestanddelen met het waswater alsnog gewonnen worden. De ontvezelde slurrie bestaat dan uit een mengsel van toegevoegd water, weefselvocht, celinhoudbestanddelen en fijn gedispergeerde celwanden afkomstig uit het

5 parenchymatisch weefsel. Uit de ontvezelde slurrie of sapstroom kunnen inhoudsstoffen worden gewonnen in min of meer zuivere vorm zoals: (recombinante) eiwitten, peptiden en (hoogwaardige) aminozuren, vaccins, antibiotica of andere in de geneeskunde belangrijke

10 factoren, enzymen, pigmenten, lipiden, vetzuren, zetmelen, oplosbare suikers en (celwand)koolhydraten voor toepassing in de veevoeding, humane voeding, of als substraat voor fermentaties, of kunnen door concentratie (vee)voedingsproducten gemaakt worden met een hoge

15 voedingswaarde als gevolg de aanwezigheid van hoogwaardige eiwitten, peptiden, aminozuren of andere componenten en/of als gevolg van de verwijdering van de niet- of slecht verteerbare vezelfractie.

De ontvezelde slurrie kan in vervolgstappen verder

20 gefractioneerd worden. Een mogelijkheid is bijvoorbeeld het afscheiden van alle vaste delen door middel van centrifugeren, al dan niet voorafgegaan door een coagulatiestap middels verhitting, aanzuring of op andere wijze. Een andere mogelijkheid is de parenchymatische

25 celwanden in oplosbare suikers om te zetten met behulp van celwandsplitsende enzymen (pectinases, cellulases etc.) en aldus toe te voegen aan de fractie opgeloste stof in de ontvezelde slurrie.

Kenmerk van de werkwijze zoals voorzien door de

30 uitvinding is de splitsing op weefselniveau in een vezelfractie die de relatief stevige weefsels bevat (vaatbundels, sclerenchym en epidermis) en een ontvezelde fractie die de relatief zachte weefsels (parenchym) met hun inhoud bevat. Kort samengevat is het verschil tussen

35 de traditionele en nieuwe werkwijze de onttrekking van weefselvocht (traditioneel) versus weefselsfractionering

(nieuwe werkwijze). De nieuwe werkwijze voorziet in het met een hoog rendement winnen van componenten uit planten, terwijl met een traditionele werkwijze grote hoeveelheden hoogwaardige component in bijvoorbeeld het
5 uitgeperste materiaal achterblijven, of een erg hoge energie behoefte hebben.

Met name ook genetisch gemodificeerde cultuurgewassen, waarbij de plant zodanig is veranderd dat deze preferentieel een of meer componenten in bijvoorbeeld de
10 cytosol of in een cel organel tot expressie brengt, komen in aanmerking tot verwerking volgens een werkwijze voorzien door de uitvinding. Ook bij genetisch gemodificeerde planten (en met name bij die waarbij de door de genetische manipulatie verkregen stapeling van
15 een (recombinante) hoogwaardige component door meerdere delen van de plant is verspreid) is een goede ontsluiting van de plantencel en zijn inhoud van groot belang, zodat een product verkregen middels moderne biotechnologische manipulatie van een dergelijk cultuurgewas met het hoogst
20 mogelijke rendement kan worden gewonnen. Toepassing van een werkwijze volgens de uitvinding maakt het bijvoorbeeld mogelijk ook genetisch gemodificeerde planten, waarbij de door de genetische modificatie in hoeveelheid toegenomen, of de de novo aanwezige
25 component, zoals een vaccin, een antibioticum of een andere factor die in de (dier)geneeskunde belangrijk is, of (recombinante) hoogwaardige eiwitten, peptiden of aminozuren, evenredig in het parenchym van alle blad-stengel- en/of wortel- of knoldelen aanwezig is, met hoog
30 rendement te benutten, doordat vrijwel volledige winning van de in het parenchym aanwezige plastiden, zoals chlorolasten, amyloplasten, elaioplasten en chromoplasten omvat, eenvoudig te scheiden is van de vezelfractie door toepassen van een werkwijze volgens de uitvinding.

35 De uitvinding voorziet bijvoorbeeld ook in het scheiden van componenten uit wortel- en/of knoldelen van

wel of niet genetisch gemodificeerde gewassen zoals suikerbieten. Gewassen suiker bieten worden in een uitvoering van een werkwijze volgens de uitvinding in voorgehakselde of voorgesneden vorm gedoseerd in een
5 refiner. Tijdens deze processgang wordt het knolweefsel vervezeld tot een pulp. Na de vervezeling stap wordt de vezelfractie van de sapstroom gescheiden bijvoorbeeld middels zeven, filtreren of centrifugeren, en wordt de
10 vaste fractie eventueel gewassen met water om de hierin nog oplosbare componenten te winnen. De vloeibare fractie of sapstroom kan na centrifugatie verder worden verwerkt tot winning van de suikers op de wijze zoals gebruikelijk in de suikerindustrie (carbonatie, indikking, kristallisatie, centrifugatie, etc.) Door toepassing van
15 de werkwijze volgens de uitvinding is de gangbare diffusie stap niet meer nodig. Niet 1100 liter water wordt gewonnen maar een reeds hoog geconcentreerde sapstroom is het resultaat. Behalve een directe kostenbesparing als gevolg van eliminatie van de diffusie
20 stap, zal ook de concentratie van het suiker in het serum of sapstroom hoger zijn dan die in stroom van de diffusie stap. Bovendien zal de eliminatie van de diffusie stap een besparing betekenen van de totale hoeveelheid benodigd water met een inherente besparing aan
25 verdampings en droogkosten. Door het volgen van een werkwijze volgens de uitvinding zal het suikerverlies (normaal circa 2%) sterk worden gereduceerd doordat de totale hoeveelheid aanwezige suiker in de biet in het serum blijft. Tevens is door de vervezeling de
30 vezelfractie van de suikerbiet beter verteerbaar dan de conventionele pulp, wanneer toegepast als ingrediënt van diervoeders. Ook voor genetisch gemodificeerde bieten, zoals bijvoorbeeld een bij bieten met verhoogd fructose-oligosaccharide gehalte of met verhoogde aminozuur
35 synthese geschiedt de verwerking bij voorkeur zoals voorzien door de uitvinding.

De uitvinding voorziet ook in een inrichting voor het toepassen van een werkwijze volgens de uitvinding. Een dergelijke inrichting is gekenmerkt door middelen geschikt voor het vervezelen volgens de uitvinding

5 waarbij het relatief stevige vaatbundelweefsel met bijvoorbeeld het sclerenchym en de epidermis (tezamen de vezelfractie) mechanisch wordt losgemaakt van het overige in hoofdzaak parenchymatische weefsel. Dit parenchymatische weefsel wordt tegelijkertijd ontsloten

10 en de celinhoudbestanddelen (cytosol en parenchym) hieruit komen hierbij nagenoeg volledig beschikbaar. Met vervezeling wordt hier bedoeld dat het plantenmateriaal wordt blootgesteld aan dusdanige krachten dat de relatief stevige weefsels vrijwel geheel losgemaakt worden van de

15 relatief zachte weefsels. Als resultante van de krachten welke deze vervezeling bewerkstelligen zal het overgrote deel van de, zo niet vrijwel alle, plantencellen, worden ontsloten waardoor het cytosol vrijkomt. Deze cytosol laat zich als sapstroom, met daarin in het algemeen ook

20 resten van de organellen en de cel omgevende lipiden membraan en parenchymatische celwanden, relatief eenvoudig middels zeven, of andere aan de vakman bekende scheidingsmiddelen van de vezelcomponent scheiden.

Een eerste voordeel van de uitvinding is hierin

25 gelegen dat het rendement van de werkwijze niet afhankelijk is van de turgor van de in het materiaal aanwezige plantencellen, waardoor deze met groter rendement dan gebruikelijk in de bovenomschreven persmethoden ontsloten kunnen worden.

30 Een tweede voordeel van de uitvinding is hierin gelegen dat de uitvinding voorziet in twee productstromen welke op zich erg zuiver zijn. Een eerste, de vezelfractie bevat voornamelijk cellulose en hemicellulose, voornamelijk bestaande uit de elementen C,

35 H en O (wat op zich voordelen oplevert voor een schone verbranding), een tweede bevat alle waardevolle en

gecompliceerde inhoudsstoffen, en bijvoorbeeld de recombinante component(en), die in het parenchym en cytosol te vinden zijn, en welke relatief eenvoudig verder kunnen worden gescheiden.

5 De twee productstromen zijn door bijvoorbeeld zeven van elkaar te scheiden. Andere scheidingsmethoden zijn ook denkbaar, b.v. centrifugeren, verwerken middels (hydro)cycloon en centrizeven, en decanteren of sedimenteren, of combinaties van deze methoden. Bij het
10 ontvezelen wordt de vrijgemaakte vezel middels bijvoorbeeld zeven afgescheiden van de overige plantenbestanddelen. Door wassen en zeven kan de vezel verder gezuiverd worden en kunnen zoveel mogelijk niet-vezelbestanddelen met het waswater als nog gewonnen
15 worden. De ontvezelde slurrie bestaat dan uit een mengsel van toegevoegd water, weefselvocht, celinhoudbestanddelen en fijn gedispergeerde celwanden afkomstig uit het parenchymatisch weefsel.

Een eerste productstroom zoals voorzien door de
20 uitvinding is een (in het algemeen hoogwaardige) sapstroom bestaande uit een waterige oplossing/suspensie van nagenoeg alle hoogwaardige (recombinante) componenten of voedingsstoffen uit het plantaardig materiaal (zoals suikers, eiwitten, lipiden, pigmenten, en dergelijke).
25 Door verwijdering van de (in nutritionele zin laagwaardige) celwandvezelcomponenten ontstaat (op basis van droge stof) deze relatief hoogwaardige productstroom, waaruit de diverse componenten relatief eenvoudig verder kunnen worden geïsoleerd. Het ontvezelde product of de
30 sapstroom bestaat in hoofdzaak uit parenchym, deels als intacte cellen deels als gedesintegreerd celmateriaal. De kleur van het ontvezelde product is in de regel groen door de aanwezigheid van intacte of kapotte chloroplasten, soms bruingroen door bruinverkleuring
35 tijdens het fractioneren. Macroscopisch gezien is het een vloeistof. Microscopisch zijn in deze vloeistof

voornamelijk intacte en gedesintegreerde parenchymcellen zichtbaar en celorganellen zoals chloroplasten.

De sapstroom van dergelijke genetisch gemodificeerde plantenmaterialen volgens de uitvinding wordt verder
5 behandeld, bijvoorbeeld middels zeven, waarna bijvoorbeeld het (recombinante) eiwit, peptiden, aminozuren, en andere (recombinante) componenten in het sap gewonnen wordt middels bijvoorbeeld coagulatie door bijvoorbeeld zuur- en/of hitte-behandeling. Ook kan de
10 sapstroom verder worden bewerkt middels (ultra- of membraan)filtratie, drogen, fermentatie of andere aan de vakman bekende methoden. Eiwitrijke of anderszins hoogwaardige voedingsstoffen voor menselijke en dierlijke consumptie, maar ook kleurstoffen zoals caroteen (pro-
15 vitamine A), en specifiek recombinante producten kunnen op deze manier uit cytosol, ook uit dat van blad- en/of stengeldelen worden gewonnen.

De tweede productstroom, de vezelfractie zoals voorzien door de uitvinding bestaat uit de relatief harde
20 weefsels. Dit zijn in de regel de vaatbundels, het sclerenchym en de epidermis. De celinhoud is in deze weefsels afwezig of wordt tijdens het fractioneren en wassen nagenoeg geheel verwijderd. Vezel bestaat daardoor overwegend uit celwandcomponenten. Chloroplasten zijn in
25 een zuiver vezelpreparaat nagenoeg afwezig. De kleur van de gewassen vezel varieert in de regel van wit tot geel of lichtbruin. Soms kan een lichtgroene kleur ontstaan door impregnatie met chlorofyl tijdens de winning. Macroscopisch gezien heeft de vezelfractie een
30 vezelstructuur voornamelijk door het draadvormige karakter van de vaatbundels. Microscopisch gezien zijn naast de draadvormige structuren van vaatbundels en sclerenchym in de regel ook stukken epidermis weefsel herkenbaar bestaande uit vellen van één cel laag dik. De
35 vaatbundels zijn opgebouwd uit meerdere cellen waaronder houtvaten en zeefvaten. Afhankelijk van de mate van

vervezeling komen ook vezels bestaande uit één cel voor en voorts de restanten van celwanden en (spiraal-, net- of ringvormige) celwandverdikkingen. Typerend voor de epidermis-vellen is de aanwezigheid van huidmondjes en kiezelszuurtandjes of haren.

De vezelstroom zoals voorzien door de uitvinding bestaat nagenoeg uitsluitend uit een natte vaste vezelstroom (hoofdzakelijk cellulose en hemi-cellulose) met in principe geen nutritionele waarde aangezien deze fractie niet direct, en slechts gering microbiologisch verteerbaar is. Echter, het ontbreken van verteerbaarheid maakt het gebruik van de vezelsstroom voor niet-voedsel toepassingen mogelijk, dit in tegenstelling tot bijvoorbeeld de perskoek afkomstig uit bovenomschreven traditionele persmethoden waar de perskoek eigenlijk alleen geschikt is voor voedertoepassingen en spoedig zou verrotten als deze niet tot voedsel werd bereid en gegeten werd.

Bijvoorbeeld, de uitvinding voorziet in het gebruik van een vezelfractie voor de productie van energie. De vezelfractie bevat voornamelijk de koolhydraten cellulose en hemicellulose (samengesteld uit voornamelijk de elementen C, H en O), welke uitstekend brandbaar zijn en dus met hoog rendement kunnen worden omgezet in bruikbare energie in bijvoorbeeld een warmte-kracht centrale en waarvan bij verbranding geen of slechts geringe uitstoot van schadelijke stoffen te verwachten valt. Het verwerken van plantenmateriaal volgens een werkwijze als voorzien door de uitvinding, gevolgd door het gebruiken van de resulterende vezelfractie als brandstof, zal bijdragen aan het verminderen van de CO₂-uitstoot aangezien het hier een niet fossiele brandstof betreft. Tevens zal de verbranding van de vezelfractie op zich schoner zijn voor het milieu daar de vezelfractie niet of nauwelijks verontreinigd is met de normaal in droog planten materiaal voorkomende zoutresiduen (zoals K, Na, Cl, P

verbindingen) en eiwitresten (met daarin ook S en N
verbindingen). Deze zoutresiduen en eiwitresten,
afkomstig uit het cytosol zijn met de sapstroom,
gescheiden van de vezelfractie. Verbranding van de
5 vezelfractie (met daarin voornamelijk C, H en O
verbindingen welke door verbranding omgezet worden in H₂O
en CO₂) zal dus een veel kleinere milieubelasting met zich
meebrengen dan verbranding van ander plantenmateriaal
waarin al deze zoutresiduen en eiwitresten nog aanwezig
10 zijn. Eiwitverbranding draagt met name bij aan de
uitstoot van zwavel en stikstof verbindingen zoals zwavel
en stikstof oxiden, onbrandbare zoutresiduen zullen
bijdragen aan het rest-as volume, bij de verbranding van
een vezelfractie volgens de uitvinding zal de uitstoot
15 van bijvoorbeeld zwavel en stikstof oxiden, en het rest-
as volume met daarin de zoutresten veel kleiner zijn.

Aangezien het vezelmateriaal van organische herkomst
is is het bijvoorbeeld ook als turfvervanger in
bijvoorbeeld potgrond of in tuinbouwteeltsubstraten
20 toepasbaar.

In een voorkeursuitvoering van de uitvinding wordt
het plantenmateriaal dermate sterk vervezeld, totdat
bijvoorbeeld het vezelmateriaal voornamelijk uit
elementair vezels bestaat, zodat de zo ontstane
25 vezelcomponent of vezelstroom bijvoorbeeld geschikt is
voor verdere verwerking tot karton- en/of papier, of kan
worden gebruikt als (natuurlijke) vezel in composieten
tezamen met en ter versterking van (kunst)harsen.

Voorbeelden van plantaardig materiaal dat behandeld
30 kan worden met een werkwijze volgens de uitvinding zijn
genetisch gemodificeerde (voeder)gewassen zoals grassen
(granen zoals tarwe, rogge en mais inbegrepen), luzerne,
maar ook oogstresiduen van gewassen waar van
normalerwijze de blad-en/of stengel delen niet worden
35 verwerkt, zoals aardappel of (suiker)bietenloof wat in
het algemeen bij de oogst op het land achterblijft. Het

hoge rendement van een werkwijze volgens de uitvinding maakt het bewerking van dergelijke plantaardige materialen rendabel.

De uitvinding voorziet tevens in een werkwijze tot
5 scheiding van componenten uit plantaardig materiaal
waarbij het betreffende materiaal relatief lang geleden
is geoogst en al, tenminste al ten dele, is uitgedroogd,
of waarbij het plantaardig materiaal niet meer als vers
en groen is te omschrijven, maar bijvoorbeeld door
10 rijping een meer houtig en/of droog karakter heeft
verkregen. Dergelijke materiaal is voor het verwerken in
een persmethode niet geschikt, maar is nu uitstekend
verwerkbaar, aangezien de mate van turgor van de te
ontsluiten plantencel bij toepassen van een werkwijze
15 volgens de uitvinding niet belangrijk is.

De uitvinding voorziet in een refiner, of een inrichting
met vergelijkbare werking, en het gebruik van een
dergelijke inrichting, bijvoorbeeld voor het scheiden van
componenten uit plantaardig materiaal dat (nog) geen of
20 slechts een geringe verhouting vertoont en waarin
parenchym aanwezig is. Dit parenchym met de daarin
aanwezige cytosol is de basis van de sapstroom zoals
voorzien door de uitvinding. Een refiner wordt in het
algemeen gebruikt om hout snippers af te breken tot
25 vezels met het doel pulp te maken voor de productie van
papier en/of karton. De uitvinding voorziet in het
verwerken middels een refiner van een genetisch
gemodificeerd gewas. Refiners worden in het algemeen niet
voor vers en/of groen materiaal gebruikt, aangezien hout
30 voornamelijk uit dood of verhout weefsel bestaat waar het
meeste parenchym, met chloroplasten, uit verdwenen is.
Verschillende typen refiners zijn bekend aan de vakman,
er zijn bijvoorbeeld refiners met conische schijven of
met platte schijven. De uitvinding voorziet in het
35 gebruik van beide typen, en/of gelijkwaardige
inrichtingen, bijvoorbeeld van een convex/concaaf type

samengestelde maalschijven, in een methode voorzien door de uitvinding.

De uitvinding wordt verder toegelicht in het experimentele gedeelte van de beschrijving, zonder deze
5 te beperken.

Experimentele gedeelte

In onderzoek is de vinding vergeleken met de
10 traditionele techniek. Dit is gebeurd met behulp van een lab(oratorium)-protocol en met behulp van industriële apparatuur. Op basis hiervan kan de aard van de vezelfractie beoordeeld worden en kan de winbaarheid van inhoudsstoffen bij beide methodes vergeleken worden.
15 Resultaten die hieronder getoond worden, illustreren het verschil in de winbaarheid van eiwit en andere inhoudsstoffen.

Traditionele werkwijze

20 In de experimenten op laboratorium schaal werd de traditionele werkwijze van malen en persen gesimuleerd door materiaal te verpulpen in een Tecator Homogenizer en de pulp uit te persen met behulp van een aangepaste trek-drukbank van Lloyd Instruments. Deze was voorzien van een
25 beker met geperforeerde bodemplaat (oppervlak 50 cm²) waarin 100 g verse pulp geperst werd bij een druk oplopend tot 10 bar, gedurende 15 minuten. Het oorspronkelijke materiaal en het uitgeperste sap werden geanalyseerd op stikstofgehalte en de winbaarheid van
30 eiwit werd berekend als de hoeveelheid ruw-eiwit (hoeveelheid stikstof vermenigvuldigd met 6.25) in sap uitgedrukt als percentage van de hoeveelheid ruw-eiwit in het oorspronkelijke materiaal.

35 Op grotere schaal werd een hamermolen van het type Jenz A230 ingezet om gras te desintegreren en werd de aldus

verkregen grasulp uitgeperst in een Vetter schroefpers met een compressievoud van 1:7.65 en een perforatie van de cilinderwand van 0.7 mm. Door plantenmateriaal één of meerdere malen de hamermolen te laten passeren kon het
5 materiaal meer of minder ver gedesintegreerd worden.

Nieuwe werkwijze

In de experimenten op laboratorium schaal werd de nieuwe werkwijze gesimuleerd door vers gras fijn hakselen in een
10 cutter, vervolgens 30 g fijn gehakselde gras stukjes met 400 ml water mengen en gedurende 10 minuten te vervezelen in een blender, de slurrie uit de blender te zeven op een 850 micron zeef, en de afgezeefde vezelfractie te wassen en te drogen. De vezel werd geanalyseerd op gehaltes aan
15 stikstof, as en celwanden en hiermee werd de samenstelling van de ontvezelde slurrie berekend. De vezelopbrengst werd bepaald als de hoeveelheid drogestof in de vezelfractie als percentage van de hoeveelheid drogestof in het uitgangsmateriaal. De winbaarheid van
20 eiwit werd berekend als de hoeveelheid ruw-eiwit in de ontvezelde slurrie uitgedrukt als percentage van de hoeveelheid ruw-eiwit in het oorspronkelijke materiaal.

Ook werd de nieuwe werkwijze beproefd met een Sprout-
25 Waldron 12 inch drukrefiner, met maalschijven van het type D2A505. Het refinieren of vervezelen van vers gras vond plaats onder atmosferische omstandigheden bij een schijfafstand van 0.04 mm, onder toevoeging van water tot een consistentie van ca. 2% drogestof. De vezel werd
30 vervolgens afgezeefd op een zeef met openingen van 140 micron.

Ook werd de nieuwe methode uitgetest op semi-technische schaal met behulp van een Sunds Disk Refiner type RO 20
35 FLUFF serie nr. 3838, bouwjaar 1985, voorzien van maalschijven met een hoge of lage weerstand tegen

doorvoer. Met deze refiner werd o.a. het effect van schijftype en schijfafstand onderzocht op doorvoer en vezelsamenstelling.

- 5 Het refinieren vond plaats onder atmosferische omstandigheden met gehakseld gras, met of zonder toevoeging van water. Ook werd het vervezelen van aardappelloof getest.
- 10 Het gras was afkomstig van zowel cultuurgrasland als natuurterreinen en werd in verse, gehakselde vorm verwerkt. Monsters van het vervezelde materiaal werden met de hand gespoeld en afgezeefd en geanalyseerd op stikstof- en asgehalte. De winbaarheid van ruw-eiwit werd
- 15 berekend op basis van een gemiddeld vezelaandeel van 33% van de gras-drogestof.

- Het aardappelloof was afkomstig van zetmeelaardappelplanten tijdens de volle groeifase van de
- 20 aardappelplant. Het loof werd machinaal getrokken en was daardoor in zeker mate gekneusd. Het aardappelloof bestond uit stengels en bladeren. Het aardappelloof werd, zonder wassing vooraf vers verwerkt met de refiner, zonder toevoeging van water. Het vervezelde materiaal
- 25 werd met de hand uitgeperst.

Resultaten van onderzoek:

Figuurbeschrijvingen

Figuur 1 en figuur 2 (detail)

Perskoek van gras (links) en grasvezel (rechts) afkomstig
5 uit Engels Raaigras (*Lolium perenne*).

In de perskoek valt de groene kleur op als gevolg van de
aanwezigheid van chloroplasten. Tevens zijn
bladfragmenten herkenbaar aan hun grootte (doorsnede
groter dan 1 mm) en de kenmerkende ribbels op de
10 bovenzijde van het blad. De grasvezel onderscheidt zich
door de lichte kleur (vrijwel complete afwezigheid van
chloroplasten), de draadvormige structuur en de geringe
diameter van de individuele vezels (in dit geval zeer
veel kleiner dan 1 mm). De afstand tussen opeenvolgende
15 cijfers is 1 cm.

Figuur 3

Suspensie van grasvezel uit Engels Raaigras (*Lolium*
20 *perenne*).

Zichtbaar zijn vezelvormige structuren (vaatbundels) met
een diameter van enkele tientallen micrometer en
epidermisvellen met een kleinste diameter tot enkele
25 honderden micrometer.

Figuur 4

Microscopische opname van epidermis in grasvezel
afkomstig uit Engels Raaigras (*Lolium perenne*).

30

Kenmerkend is de aanwezigheid van huidmondjes bij Engels
raaigras geconcentreerd in de epidermis van de bovenzijde
van het blad. Het compactere weefsel terzijde van de
huidmondjes is onderliggend sclerenchym. De langwerpige
35 epidermiscellen hebben een dwarsdoorsnede van ca. 20
micrometer.

Figuur 5

Microscopische opname van vaatbundels in grasvezel afkomstig uit Engels Raaigras (*Lolium perenne*).

5

Kenmerkend voor vaatbundels zijn de opbouw uit meerdere cellen en de aanwezigheid van vaten met netvormige verdikkingen. De diameter van de vezel in het midden van de figuur bedraagt ca. 50 micrometer.

10

Figuur 6

Microscopische opname van parenchymcellen in de sapstroom van ontvezeld gras afkomstig uit Engels Raaigras (*Lolium perenne*). Deze sapstroom behoort bij de vezelfractie van figuren 1 en 2.

15

Kenmerkend voor parenchymcellen in grasbladeren is de overvloedige aanwezigheid van chloroplasten. Sommige parenchymcellen zijn echter kapotgegaan tijdens het fractioneren: alleen de celwand is nog zichtbaar, de chloroplasten komen geïsoleerd voor in de omringende vloeistof. De grootte van deze parenchymcellen bedraagt ca. 20 * 40 micrometer. De in deze figuur getoonde fractie is voor het fotograferen verdund om de relatief grote hoeveelheid parenchymcellen in de sapstroom volgens de uitvinding tot uiting te laten komen.

20

25

Figuur 7

Microscopische opname van parenchymcellen in perssap van gras afkomstig uit Engels Raaigras (*Lolium perenne*).

30

Dit perssap behoort bij de perskoek van figuren 1 en 2.

De in deze figuur getoonde fractie is voor het fotograferen geconcentreerd om de relatief kleine hoeveelheid parenchymcellen in het perssap tot uiting te laten komen.

35

Figuur 8

Processchema voor het vervezelen of refinieren van gras.

Figuur 9

5 Processchema voor het vervezelen of refinieren van gras.

Figuur 10

Processchema voor het vervezelen of refinieren van gras.

Vervezeling

- Tabel 1. Vezelsamenstelling en vezelopbrengst van
geteelde grassen, per soort en ras gemiddeld gedurende
5 het seizoen, en van enkele andere gewassen.

Soort/Ras	Stikstof- gehalte (g/kg ds**)	Asge- halte (g/kg ds)	Celwand gehalte (g/kg ds)	Vezelopbrengs % van drogestof in grondstof
Grassen				
<i>Lolium perenne</i> 4n Vr.*	4.0	50.6	867	28
<i>Lolium perenne</i> 2nVr.	4.3	43.5	865	34
<i>Lolium perenne</i> 4n Lt.	4.5	41.1	879	29
<i>Lolium perenne</i> 2n Lt.	5.4	34.7	857	29
<i>Lolium multiflorum</i> 4n	3.8	47.4	877	24
<i>Lolium multiflorum</i> 2n	4.4	36.6	880	27
<i>Phleum pratense</i>	4.3	39.8	862	30
<i>Festuca arundinacea</i>	4.4	36.7	867	29
<i>Dactylis glomerata</i>	5.1	42.0	873	32
<i>Festuca pratensis</i>	4.5	44.2	872	32

 Overige plantenmaterialen

Luzerne	5.7	18.9	824	28
Aardappelloof jong	4.2	26.1	836	16
Aardappelloof oud	3.7	50.7	714	21
Erwtenloof	4.8	25.7	832	29
Bietenloof	12.0	79.7	680	9

*) 4n en 2n: resp. tetraploid en diploid; Vr. en LT.:
resp. vroeg- en laatbloeiend

5 **) ds: drogestof

Vervezelen van plantaardige biomassa levert een
vezelfractie op die afhankelijk van de aard van het
materiaal kan variëren van minder dan 10% tot meer dan
10 30% van de drogestof. Het exacte getal is ook afhankelijk
van de maaswijdte van de zeef waarmee de vezel
afgescheiden wordt en de intensiteit van wassen. De
vezelfractie bestaat in het geval van *Lolium perenne* in
de regel voor meer dan 80% uit celwandmateriaal en heeft
15 een stikstofgehalte meestal lager dan 6-8 g per kg
drogestof en een asgehalte meestal lager dan 50-100 g per
kg drogestof.

Tabel 2. Samenstelling vezel

		refiner	lab-protocol
As (g/kg ds)		22.3	26.0
5	Stikstof (g/kg ds)	5.3	4.4
	Celwanden (g/kg ds)	808	792

De samenstelling van de vezelfractie is vergelijkbaar
voor de experimenten met de refiner en de experimenten
10 volgens het lab-protocol.

Ontvezeling

Tabel 3. Samenstelling van gras en van de ontvezelde
grasslurrie.

5

		Gras	Ontvezelde slurrie	
			refiner	lab-protocol
As (g/kg ds)		92.6	138	139
10	Stikstof (g/kg ds)	31.0	47.4	48.7
Celwanden (g/kg ds)		544	375	438

De ontvezelde slurrie bevat naast de
celinhoudbestanddelen (zoals eiwit) ook een deel van de
15 celwanden uit het plantenmateriaal. Dit zijn in hoofdzaak
de celwanden uit het zachte parenchymatische weefsel die
bij vervezelen desintegreren en vervolgens bij ontvezelen
de zeef passeren als fijn gedispergeerd materiaal. De
hoeveelheid aanwezig in de ontvezelde slurrie is mede-
20 afhankelijk van de diameter van de zeefopeningen.

Tabel 4. Winbaarheid van ruw-eiwit uit geteelde grassen, per soort en ras gemiddeld gedurende het seizoen, en van enkele andere plantenmaterialen, bij malen+persen en bij ontvezelen.

5

Soort/Ras	Malen + persen (%)	Ontvezelen (%)
Grassen		
<i>Lolium perenne</i> 4n Vr.	30	95
<i>Lolium perenne</i> 2n Vr.	23	94
<i>Lolium perenne</i> 4n Lt.	22	95
<i>Lolium perenne</i> 2n Lt	16	94
<i>Lolium multiflorum</i> 4n	41	96
<i>Lolium multiflorum</i> 2n	35	95
<i>Phleum pratense</i>	11	94
<i>Festuca arundinacea</i>	21	94
<i>Dactylis glomerata</i>	31	93
<i>Festuca pratensis</i>	17	94
Overige materialen		
Luzerne	52	95
Aardappelloof jong	51	98
Aardappelloof oud	42	95
Erwtenloof	16	95
Bietenloof	24	95

Ontvezeling levert een slurrie die meestal meer dan 70%, en bij voorkeur meer dan 80% of 90% van alle ruw-eiwit uit het plantaardig materiaal bevat. Dit eiwit kan hieruit gewonnen worden door centrifugeren al dan niet voorafgegaan door hitte-coagulatie.

Bij de traditionele werkwijze van fractioneren bedraagt de winbaarheid van ruw-eiwit meestal minder dan 50%.

Tabel 5. Vergelijking van eiwitwinbaarheid uit gras bij herhaalde passage door hamermolen gevolgd door uitpersen in een schroefpers, en bij vervezelen volgens de uitvinding.

5

Eiwitwinbaarheid	
(%)	
10	Hamermolen +schroefpers
	Passages door hamermolen
	1x 28
	2x 30
15	4x 35
	8x 43

Vervezelen 93-96
volgens de uitvinding

20

Ook bij herhaald desintegreren van gras in een hamermolen gevolgd door uitpersen in een schroefpers bleek de eiwitwinbaarheid minder dan de helft van de
25 eiwitwinbaarheid gemeten bij vervezelen van gras.

Processchema's voor het refinieren van ondergrondse delen van gewassen zoals knollen en wortels.

- 5 Gewassen suiker bieten worden in voorgehakselde of voorgesneden vorm gedoseerd in een refiner. Tijdens deze processgang wordt het knolweefsel vervezeld tot een pulp. Na de vervezeling stap wordt de vezelfractie van de sapstroom gescheiden bijvoorbeeld middels zeven,
- 10 filtreren of centrifugeren, en wordt de vaste fractie eventueel gewassen met water om de hierin nog oplosbare componenten te winnen. De vloeibare fractie of sapstroom wordt na centrifugatie verder verwerkt tot winning van de suikers op de wijze zoals gebruikelijk in de
- 15 suikerindustrie (carbonatie, indikking, kristallisatie, centrifugatie, etc.) Door toepassing van de werkwijze volgens de uitvinding is de gangbare diffusie stap niet meer nodig. Niet 1100 liter water wordt gewonnen maar een reeds hoog geconcentreerde sapstroom is het resultaat.
- 20 Behalve een directe kostenbesparing als gevolg van eliminatie van de diffusie stap, zal ook de concentratie van het suiker in het serum of sapstroom hoger zijn dan die in stroom van de diffusie stap. Bovendien zal de eliminatie van de diffusie stap een besparing betekenen
- 25 van de totale hoeveelheid benodigd water met een inherente besparing aan verdampings en droogkosten. Door het volgen van een werkwijze volgens de uitvinding zal het suikerverlies (normaal circa 2%) sterk worden gereduceerd doordat de totale hoeveelheid aanwezige suiker in de biet
- 30 in het serum blijft. Tevens is door de vervezeling de vezelfractie van de suikerbiet beter verteerbaar dan de conventionele pulp, wanneer toegepast als ingrediënt van diervoeders.
- 35 De uitkomsten van de proeven met de Sunds Disk Refiner staan vermeld in Tabel 6.

Keuze van plaattype en schijfafstand bepalen de mate van
vervezeling maar slechts in geringe mate de
eiwitwinbaarheid. Een hoge doorzet was mogelijk in
combinatie met een hoge eiwitwinbaarheid (i.c. >85%)
5 zowel met eiwitrijk cultuurgras als met eiwitarm
natuurgras.

Aardappelloof is goed verwerkbaar met de refiner. In de
vezelfractie is het gehalte aan houtige vezels relatief
10 hoog omdat het oorspronkelijke aardappelloof naast
bladweefsel ook uit stengelweefsel bestond. Het hoge
asgehalte in de vezels van het aardappelloof werd in
belangrijke mate veroorzaakt door het hoge zandgehalte in
het loof als gevolg van het niet wassen van de grondstof.

15

Tabel 6. Vezelsamenstelling en eiwitwinbaarheid bij het ontsluiten van gras en aardappellood op semi-technische schaal met behulp van een Sunds Disk Refiner.

Grondstof	samenstelling grondstof			schijf		doorvoer	samenstelling vezel		eiwitwinbaarheid
	ds	as	N	Plaatweerstand	schijf-afstand		as	(g/kg ds)	
	(g/kg vers)	(g/kg ds)	(g/kg ds)		mm	(kg ds/uur)	(g/kg ds)	(g/kg ds)	(%)
cultuur-gras	154	91	19.3	hoog	0.4	-	13	5	91
cultuur-gras	142	183	36.1	hoog	0.10	39	31	14	87
"	"	"	"	hoog	0.50	55	27	15	86
"	"	"	"	hoog	1.00	104	38	15	86
"	"	"	"	laag	0.05	157	49	14	87
"	"	"	"	laag	0.10	135	41	14	87
"	"	"	"	laag	0.50	139	54	15	86
"	"	"	"	laag	1.00	211	82	20	82
natuur-gras	215	138	12.1	laag	0.10	-	41	6	84
aardappellood	104	342	23.5	hoog	0.20	-	473	15.2	-
"	119	344	27.0	laag	0.20	-	374	19.0	-

- 5 Processchema's voor het refinieren van gewassen met
voornamelijk blad- en/of stengeldelen zoals gras.

Voorbehandeling

- 10 Bijgevoegde processchema's (zie figuren 8 tot 10) gaan uit
van de aanvoer van gehakseld gras zoals dit ook
gebruikelijk is bij de verwerking van gras en luzerne in
groenvoerdrogerijen. Normaliter ligt de haksellengte in de
orde van grootte van enkele centimeters, maar deze kan ook
15 langer of korter zijn. Voor de refiner-proef werd vers gras
voorverkleind in een Pierret guillotinehakselaar op 6 mm
deeltjeslengte, m.a.w. zeer kort. Vermoedelijk is zo'n
korte lengte niet noodzakelijk; refinieren of vervezelen van
uitgeperst gras (met een deeltjeslengte van vermoedelijk
20 enkele centimeters) leverde geen problemen op.

Wassen

- Een wasstap zal waarschijnlijk in praktijk noodzakelijk
25 zijn om zand te verwijderen en daarmee slijtage van
apparatuur te verminderen en een schoner product te kunnen
leveren. Deze wasstap kan mogelijk echter overgeslagen
worden als zand en andere verontreinigingen niet aanwezig
zijn.

30

Sulfiettoevoeging

- Toevoeging van sulfiet kan, maar hoeft niet, noodzakelijk
zijn om ongewenste complexvorming tussen eiwitten en
35 polyfenolen tegen te gaan. Op basis van ervaringen uit het

verleden met de verwerking van grassap is bekend dat dergelijke complexvorming de nutritionele waarden van graseiwitten vermindert. De omstandigheden tijdens refinieren kunnen echter anders zijn. Een snelle temperatuurstijging
5 tijdens refinieren kan enzymatische activiteit acuut stoppen (blancheer-effect) en vorming van polyfenolen afremmen.

Refinieren: basisschema (fig. 8)

10 Refinieren van gras is in principe mogelijk met en zonder vloeistoftoevoeging tijdens het refinieren. In een eerste proef verliep het proces met vers gras (15% drogestof) niet vlot zonder een royale bijmenging van water tot een drogestofpercentage van ca. 2%. De noodzaak van
15 vloeistoftoevoeging is waarschijnlijk mede afhankelijk van refinertype en aard van het gras (vezeligheid). Uitgeperst gras (26% drogestof) kon zonder watertoevoeging gerefined worden. Of en zo ja hoeveel water bijgemengd wordt heeft gevolgen voor de temperatuurstijging tijdens refinieren, en
20 dus voor de mate van eiwitdenaturatie en daarmee voor de vervolgstappen in het proces.

Het basisschema kent na refinieren de processtappen: uitzeven van de vezel, hitte-coaguleren van de refinervloeistof
25 gevolgd door afscheiding van de eiwitkoek middels een decanter en indampen van de onteiwitte vloeistof. Op dit basisschema zijn twee uiterste varianten denkbaar: één met een minimale toevoeging van vloeistof tijdens refinieren en één met een royale toevoeging van vloeistof. Het
30 basisschema wordt dan gewijzigd tot resp. variant A (figuur 9) en variant B (figuur 10).

Refinen: variant A (figuur 9)

Bij minimale toevoeging van retourvloeistof zal er mogelijk een flinke temperatuurstijging optreden tijdens refinieren: in
5 de proef met uitgeperst gras tot boven 70°C.

Eiwitcoagulatie en pasteurisatie zullen dan tijdens het refinieren al optreden en mogelijk kan daardoor een aparte coagulatiestap overgeslagen worden. In dat geval wordt het processchema vereenvoudigd tot refinieren - zeven - decanteren
10 - indampen: zie variant A op basisschema.

Refinen: variant B (figuur 10)

Variant B: Bij een royale toevoeging van retourvloeistof
15 kan de temperatuurstijging tijdens refinieren beperkt blijven: in de proef met vers gras tot ca. 35°C. Daardoor zal vermoedelijk een deel van het eiwit in oplossing kunnen blijven. In dat geval zijn er na het refinieren twee alternatieve routes denkbaar. De meest simpele is na
20 uitzeven van de vezel de vloeistof hitte-coaguleren en decanteren. In dat geval ontstaat één eiwitkoek en een onteiwitte vloeistof die ingedampt kan worden (zie het basisschema). Een wat complexere route (variant B) is na uitzeven van de vezel eerst decanteren waarbij een ruwe
25 eiwitkoek gewonnen wordt (ruw, d.w.z. met bijmenging van fijn verdeelde parenchymatische celwanden die de zeef passeren), vervolgens hitte-coaguleren en opnieuw decanteren. Bij deze tweede decanteerstap wordt een
30 zuiverder eiwitkoek gewonnen.

Uitzeven van de vezels

Voor het uitzeven van de vezels kunnen centrizeven ingezet worden zoals bekend bij de vakman voor het afscheiden van

aardappelvezel. In de proef werd een hellingzeef gebruikt bespannen met zeefgaas met openingen van 140 * 140 micron. Op lab-schaal werd een zeef met gaatjesdiameter van 850 en 250 micron toegepast. De ervaring hiermee is dat de meeste
5 vezels zich op een relatief grove zeef laten afscheiden. De fijnere vezelfractie kan toegevoegd worden aan de totale vezelfractie of via enzymatische vervloeiing aan de melasse, concentraat of sapstroom.

10 Wassen en drogen van vezel

De vezel die door zeven afgescheiden wordt, zal mogelijk verontreinigd zijn met opgeloste en gesuspendeerde stof. Wassen met onteiwitte retourvloeistof is dan dus nodig,
15 gevolgd door vochtverwijdering middels persen/centrifugeren en drogen.

Drogen eiwitkoek

20 De eiwitrijke koek die middels decanteren afgescheiden wordt, kan op dezelfde wijze gedroogd worden als bijvoorbeeld bekend aan de vakman voor aardappeleiwit. In geval van de aanwezigheid van een relatief hoge lipidefractie is toevoeging van een antioxidant product
25 verbeterend.

Indampen onteiwitte vloeistof

De onteiwitte vloeistof kan ingedampt worden tot een
30 suikerrijke siroop.

Uitbreidingen procesgang

Het basisschema kan verder uitgebreid worden met processen die tot doel hebben de ruwe eiwitkoek verder te raffineren. Eén mogelijke toevoeging is enzymatische vervloeiing van de parenchymatische celwanden in de ruwe eiwitkoek. De suikers
5 die dit oplevert, kunnen bijvoorbeeld toegevoegd worden aan de melasse, concentraat of sapstroom.

CONCLUSIES

1. Werkwijze voor het scheiden van componenten uit plantaardig materiaal met het kenmerk dat het materiaal op zijn minst ten dele vervezeld wordt en vervolgens zodanig wordt gescheiden in een vezelfractie en een sapstroom dat
- 5 de vezelfractie voornamelijk relatief stevige weefsels zoals epidermis, sclerenchym en vaatbundels omvat en de sapstroom voornamelijk zachte weefsels zoals parenchym en cytosol omvat.
2. Werkwijze volgens conclusie 1 waarin de sapstroom
- 10 chloroplasten omvat.
3. Werkwijze volgens conclusie 1 of 2 waarin het materiaal mechanisch vervezeld wordt.
4. Werkwijze volgens conclusie 3 waarin het materiaal vervezeld wordt middels een refiner.
- 15 5. Werkwijze volgens een der conclusies 1-4 waarin de vezelfractie middels zeven wordt gescheiden van de sapstroom.
6. Werkwijze volgens een der conclusies 1-5 waarin het plantaardig materiaal afkomstig is van een genetisch
- 20 gemodificeerde plant.
7. Werkwijze volgens een der conclusies 1-6 waarin het plantaardig materiaal tenminste afkomstig is van ondergrondse delen, zoals wortels of knollen, van een plant.
- 25 8. Werkwijze volgens een der conclusies 1-7 waarin het plantaardig materiaal afkomstig is van een cultuurgewas.
9. Vezelfractie verkregen middels een werkwijze volgens een der conclusies 1-8.
10. Gebruik van een vezelfractie volgens conclusie 9.
- 30 11. Gebruik van een vezelfractie volgens conclusie 9 voor de productie van energie of voor de productie van karton en/of papier.

12. Sapstroom verkregen middels een werkwijze volgens een der conclusies 1-8.
13. Sapstroom volgens conclusie 12 welke meer dan 55%, bij voorkeur meer dan 75%, bij voorkeur meer dan 90% van het
5 ruw-eiwit van het plantaardige materiaal bevat.
14. Gebruik van een sapstroom volgens conclusie 12 of 13.
15. Gebruik van een sapstroom volgens conclusie 12 of 13 voor de productie van voedsel.
16. Gebruik van een sapstroom volgens conclusie 12 of 13
10 voor de winning of zuivering van tenminste een inhoudsstof.
17. Gebruik van een sapstroom volgens conclusie 16 voor de winning van een koolhydraat, zoals zetmeel of suiker.
18. Gebruik van een sapstroom volgens conclusie 12 of 13 voor de winning of zuivering van recombinante producten.
- 15 19. Inrichting voor toepassing van een werkwijze volgens een der conclusies 1-8.
20. Inrichting volgens conclusie 18 welke tenminste een refiner omvat.
21. Inrichting waarin een werkwijze volgens een der
20 conclusies 1-8 wordt toegepast.

UITTREKSEL

Titel: Het scheiden en winnen van componenten uit genetisch gemodificeerde planten.

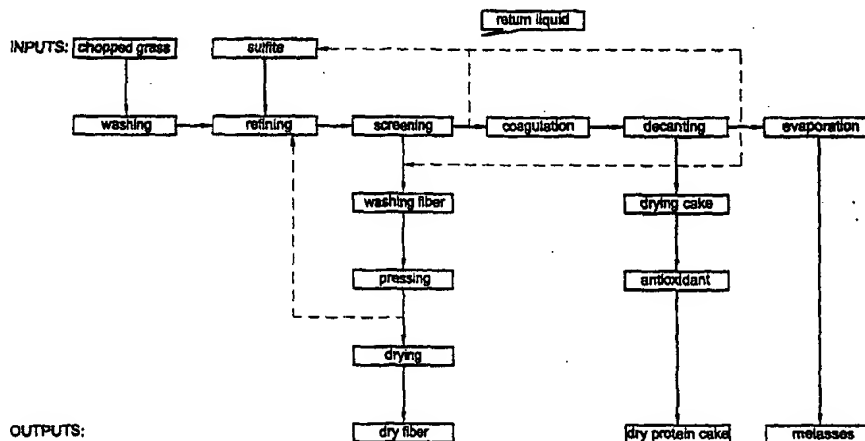
De uitvinding heeft betrekking op het scheiden en winnen van componenten uit genetisch gemodificeerde planten. De uitvinding voorziet in een werkwijze voor het scheiden van componenten uit materiaal van een genetisch gemodificeerde plant met het kenmerk dat het materiaal op zijn minst ten dele vervezeld wordt en vervolgens zodanig wordt gescheiden in een vezelfractie en een sapstroom dat de vezelfractie voornamelijk relatief stevige weefsels zoals epidermis, sclerenchym en vaatbundels omvat en de sapstroom voornamelijk zachte weefsels zoals parenchym en cytosol bevat.



INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(51) International Patent Classification ⁷ : D01B 1/42		A1	(11) International Publication Number: WO 00/40788
			(43) International Publication Date: 13 July 2000 (13.07.00)
(21) International Application Number: PCT/NL99/00805		(81) Designated States: AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).	
(22) International Filing Date: 24 December 1999 (24.12.99)			
(30) Priority Data: 1010976 6 January 1999 (06.01.99) NL			
(71) Applicant (for all designated States except US): COÖPERATIEVE VERKOOP- EN PRODUCTIEVERENIGING VAN AARDAPPELMEEL EN DERIVATEN AVEBE B.A. [NL/NL]; Beneden Oosterdiep 27, NL-9641 JA Veendam (NL).			
(72) Inventors; and (75) Inventors/Applicants (for US only): HULST, Anne, Coenraad [NL/NL]; Julianalaan 57, NL-9461 BS Gieten (NL). KETELAARS, Jan, Josef, Maria, Hubert [NL/NL]; Torckpark 40, NL-6701 ED Wageningen (NL). SANDERS, Johan, Pieter, Marinus [NL/NL]; Saaksumberg 1, NL-9722 WL Groningen (NL).		Published With international search report. In English translation (filed in Dutch).	
(74) Agent: OTTEVANGERS, S., U.; Vereenigde, Nieuwe Parklaan 97, NL-2587 BN The Hague (NL).			

(54) Title: SEPARATING AND RECOVERING COMPONENTS FROM PLANTS



(57) Abstract

The invention relates to the separation and recovery of components from genetically modified plants. The invention provides a method for separating components from a genetically modified plant, characterized in that the material is at the least partly fiberized and subsequently is separated into a fiber fraction and a juice stream, such that the fiber fraction principally comprises relatively firm tissues such as epidermis, sclerenchyma and vascular bundles, and the juice stream principally contains soft tissues such as parenchyma and cytosol.

FOR THE PURPOSES OF INFORMATION ONLY

Codes used to identify States party to the PCT on the front pages of pamphlets publishing international applications under the PCT.

AL	Albania	ES	Spain	LS	Lesotho	SI	Slovenia
AM	Armenia	FI	Finland	LT	Lithuania	SK	Slovakia
AT	Austria	FR	France	LU	Luxembourg	SN	Senegal
AU	Australia	GA	Gabon	LV	Latvia	SZ	Swaziland
AZ	Azerbaijan	GB	United Kingdom	MC	Monaco	TD	Chad
BA	Bosnia and Herzegovina	GE	Georgia	MD	Republic of Moldova	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tajikistan
BE	Belgium	GN	Guinea	MK	The former Yugoslav Republic of Macedonia	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Greece	ML	Mali	TR	Turkey
BG	Bulgaria	HU	Hungary	MN	Mongolia	TT	Trinidad and Tobago
BJ	Benin	IE	Ireland	MR	Mauritania	UA	Ukraine
BR	Brazil	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Iceland	MX	Mexico	US	United States of America
CA	Canada	IT	Italy	NE	Niger	UZ	Uzbekistan
CF	Central African Republic	JP	Japan	NL	Netherlands	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NO	Norway	YU	Yugoslavia
CH	Switzerland	KG	Kyrgyzstan	NZ	New Zealand	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Democratic People's Republic of Korea	PL	Poland		
CM	Cameroon	KR	Republic of Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kazakhstan	RO	Romania		
CU	Cuba	LC	Saint Lucia	RU	Russian Federation		
CZ	Czech Republic	LJ	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Germany	LK	Sri Lanka	SE	Sweden		
DK	Denmark	LR	Liberia	SG	Singapore		
EE	Estonia						

Title: Separating and recovering components from plants

The invention relates to the separation and recovery of components from plants.

Plants, like most organisms, are made up of cells. A plant cell consists of a lipid membrane with a generally aqueous content, the cytosol, which contains the various cell organelles (likewise surrounded by lipid membranes), such as nucleus, mitochondria, endoplasmic reticulum and chloroplasts, and the cytoskeleton, made up of microfilaments and microtubules, which gives the cell an inner structure. Also present in the plant cell are vacuoles which play an important role in keeping the plant cell under tension; the vacuoles maintain the turgor of the cell.

The constituent components of a plant cell can be roughly distinguished into water, which accounts for the greater part by far of a living cell, components such as salts, (precursors of) lipids, carbohydrates, amino acids and nucleotides, macromolecules such as starches, proteins and nucleic acid and a multiplicity of other molecules, including vitamins and pigments such as chlorophyll, carotene and xanthophyll.

A plant cell is generally surrounded by a cell wall which provides firmness and structure to the plant tissue. The cell wall is mainly built up from (hemi)cellulose and other carbohydrate polymers, which have aggregated to fiber bundles. Woody plants further contain an ample amount of lignin, a polymer made up of phenols and other aromatic monomers.

Plant tissue is made up of plant cells, all of which, when living, basically satisfy the above description. An important distinction can be made between relatively firm tissues which comprise virtually no chloroplast or other plastid containing cells, and the relatively soft tissues which generally do. Tissues which generally comprise no chloroplast containing cells are, for instance, the epidermis or skin tissue of a plant,

the collenchyma and sclerenchyma or stroma of a plant and the vascular fiber bundles or the vascular tissue, comprising the important transport vessels (wood vessels and sieve tubes) in the plant. When a part of a plant is strongly lignified, in general, over time, the majority of the cells in the

5 lignified part die off and only residues of the cell content are left. In particular the cytosol and the organelles present therein are lost, but the vascular fiber bundles, skin and stromas generally give the plant form and structure and generally remain present when the plant is dead.

Characteristically, these relatively firm tissues (in particular vascular

10 bundles, sclerenchyma and epidermis) comprise no to virtually no chloroplast containing cells, while an important part (at least in the aerial leaf and stem parts of the plant) of the relatively soft tissues, also called chlorenchyma, is made up chiefly of only chloroplast-containing parenchymal cells; indeed, this is where photosynthesis occurs. Non

15 chloroplast containing parenchyma (such as can be found, for instance, in fruits, seeds, roots and tubers of the plant, but also in the underground leaf and/or stem parts) is mainly involved in the storage of nutrients, water or gases. Such storage occurs in particular in cell organelles related to the chloroplasts, generally referred to as (pro)plastids, as in amyloplasts

20 (storage and production of carbohydrates), elaioplasts (lipids) and chromoplasts (pigments).

Genetic manipulation or modification of plants is the alteration of transferable properties or characteristics of a plant through modern recombinant or biotechnological techniques. The technique of genetic

25 manipulation was developed in plants at an experimental level in the mid-eighties. In the early nineties, this led to the first ready-for-trade products. At present, the technique is mainly applied to bacteria, fungi and plants. In animals too, however, there are possibilities. The techniques in animals at this junction are not yet optimal or non-profitable, and entail problems

30 in the field of ethics where higher developed animals are concerned.

Transferable properties are more-or-less simple properties, encoded by a gene for a particular locus. A genetically modified plant (or transgenic

plant) is a living organism to which a gene with particular properties, which has been identified in a donor organism, is transferred through genetic manipulation techniques (DNA recombination). It is also possible to genetically modify a plant, such that it can no longer activate or express a particular gene traditionally present in that plant: the gene in question is then eliminated. Due to the transferred or eliminated gene, the transgenic or modified plant acquires a new property or other characteristic, in their turn transferable to the offspring. The transfer or elimination of genes can be carried out by using, for instance, a bacterium such as *Agrobacterium tumefaciens*, which is capable of transferring genetic material to a plant cell by means of plasmids. The genes are subsequently incorporated into the genome of the infected cell. Other ways of modification can be chosen, such as bombarding a plant cell with balls enveloped with DNA fragments which include the gene to be transferred.

The use of modern biotechnology in agriculture offers new possibilities whereby, at first sight, certain yields are guaranteed and fewer phytosanitary products need to be deployed in pest and disease control, and also qualitatively high-grade products are obtained. Estimates from 1998 show that transgenic plants are grown worldwide on an area of 30 million hectares (compared to 14 million hectares in 1997). This is done mainly in the United States (88%), South America (cotton in Argentina) (6%) and Japan (6%). Figures on the area in China on which transgenic crops are grown are not known, but the percentage involved is probably considerable.

In addition to the currently marketed varieties improved by genetic manipulation - some twelve food and non-food crops - there is a rapid and gigantic progress to be expected in research in this field, even though the majority of the applications are now still in the experimental stage. Possible improvements are of major importance, in particular in the cultivation of food crops. In addition, there is the expected development of genetically modified plants for products in the non-food sector, which are a very interesting source of diversification for agriculture.

In principle, two types of genetic modifications are conceivable. A first type concerns the introduction of new properties or characteristics which promote or are helpful in the growth or cultivation of the crop in question. To be considered here are, for instance, the introduction of drought or cold resistance, so that the crop can also be grown in regions other than those where it originally thrived. The introduction of new properties or characteristics which promote or are helpful in the growth or cultivation of the crop in question also encompasses the introduction of resistance to or tolerance of herbicides, so that weed control with the herbicide in question can be carried out around the crop without the modified or recombinant crop thereby sustaining appreciable damage, or the introduction of resistance to diseases or pests.

A second type concerns the introduction or elimination of genes which enables the crop in question to yield a potentially higher-grade (recombinant) end product. To be considered here are, for instance, taste improvement or better keeping properties of products. However, a more important application is to increase or enrich the plant with valuable components or content substances. Increasing the vitamin content of a plant through genetic modification; increasing and/or enriching the protein or amino acid content, whereby the plant preferentially produces high-grade proteins or amino acids through genetic modification; improving the balance between saturated and unsaturated fatty acids through genetic modification are all examples of envisaged possibilities of genetic modification in plants.

Also envisaged are new production possibilities for highly specific compositions. In particular the production of vaccines (based on plants which express recombinant proteins or peptides), of antibiotics (based on plants which are equipped with recombinant enzymes or enzyme systems capable of producing these antibiotics), and of other factors important for human or veterinary medicine (hemoglobin, insulin, coagulation factors, growth hormone, human or animal (digestive) enzymes, and so forth) are

applications of the introduction or elimination of genes enabling the crop in question to yield a potentially higher-grade (recombinant) end product.

The current applications of introducing new properties or characteristics which promote or are helpful in the growth or cultivation of the crop in question, such as in the field of herbicide tolerance, have progressed most. They are promising for agricultural production, production cost management and with regard to the environmental consequences of agricultural activity. The resistance of plants to diseases as obtained through transgenesis offers clear advantages for the growth or cultivation of the plant in question: in particular, there are very few conventional means, and in some cases even none, for controlling bacteria and viruses. If the resistance of the plant is inherent, treatments can be omitted in nearly all cases, and the effect on the yield is then significantly higher than upon treatment.

However, in the case of introducing or eliminating genes, as a result of which the crop in question can yield a potentially higher-grade (recombinant) end product, there are also problems of a different order to be overcome. Essential questions regarding the recoverability of the desired product are, for instance: how is the high-grade product to be recovered; how do I separate the high-grade (recombinant) component from the other vegetable material; must the component to be recovered be present in certain easy to harvest parts of the plant (seeds, fruits, tubers, etc.) (which dictates strict requirements regarding the nature of the genetic modification: not only is it necessary to provide a modified gene that codes for the product in question, but also this gene needs to be expressed in the right place) or must the component in question be recovered from all parts of the plant?

The existing recovery technologies have no clear answers, and this holds in particular for protein products, for relatively low-grade products, for products which are present in the plant in a relatively low concentration, and for products which are proportionally distributed throughout the plant. It has long been known to recover various

components from vegetable raw materials for further use in, for instance, food for human or feed for animal consumption through mechanical methods. Often, plants are merely comminuted or chopped to make them suitable for consumption, an example being the chopping of corn for
5 fodder. It is clear, however, that chopping does not contribute to a better recovery of a recombinant component which is to be obtained in relative purity.

In particular the components present in the cytosol of the plant cell are outstandingly suitable for human food or animal fodder, since these
10 can be building materials for corresponding components which are found in animal cells. For that reason, in particular specific parts of a plant, such as seeds, tubers, roots or fruits which are specifically rich in, for instance, juice, sugars, protein, oil or starch are sometimes subjected to further-reaching recovery methods, such as pressing or grinding.
15 Examples are the pressing of oil from olives or oil-containing seeds, the recovery of protein from soybeans, or the grinding of potatoes or grain kernels to form flour. Another known example is the squeezing of juice from fruits such as grapes, for direct consumption or for further processing. In the case of grape juice, this concerns mainly the water, the
20 sugars and the color and flavor, and the further conversion to wine.

An example of a recovery of a vegetable raw material where no pressing method is used, is the recovery of sugar from, for instance, sugar beet. Beets are generally cut up into narrow strips (sometimes referred to as chips) whereafter the chips are flushed with hot water in a diffusion
25 tower. During this diffusion process, the sugar diffuses from the beet cells. The sugar is released relatively readily from cells already damaged, but needs to be released from the intact beet cell - present, of course, in much greater numbers - through osmosis and/or dialysis. This osmosis and dialysis can only be done profitably when the temperature is accurately
30 controlled throughout the process, for instance at 72° C. and using sufficiently large amounts of water. It can be stated that per ton of sugar beet, at least 1100 liters of water are needed. Through a countercurrent

principle, the sugar-rich water is separated from the wet chips (now called pulp). The wet pulp is dried, and the sugar water (optionally after filtration, carbonation and other pretreatments) is evaporated. Drying the pulp and evaporating the sugar-rich water to thick juice, also called
5 serum, requires much energy.

Traditionally, mechanical processing has also been applied to feed crops, such as grass, lucerne and other fresh and green harvested plants which, often as virtually whole plant, and in particular the leaf and/or stem parts and in most cases not including the roots, are used for
10 recovering, for instance, (animal) food components. Such vegetable raw materials are generally recovered through pressing of (preferably chopped or otherwise comminuted) leaf and/or stem material, whereby a part of the vegetable material is obtained as press juice, while the residual and pressed material is known as press cake. These techniques are also
15 available when the material would originate from genetically modified plants.

However, the pressure forces exerted by pressing generally result in only partial opening up (snapping or bursting) of plant cells in the material, so that only a portion of the aqueous but food component-rich
20 cytosol, possibly with residues of the organelles and the lipid membrane surrounding the cell, is liberated from the cell as press juice. The efficiency of such a method is therefore low. Press juice is generally treated further, for instance through screening, whereafter, for instance, the protein in the juice is recovered by means of coagulation through, for instance, acid
25 and/or heat treatment. Press juice may also be further processed, through (ultra or membrane) filtration, drying, fermentation or other methods known to the skilled person. Protein-rich or otherwise high-grade nutrients for human and animal consumption, but also pigments such as carotene (provitamin A), can be recovered from cytosol in this way only
30 with low efficiency.

The resultant, relatively dry press cake is generally regarded as less rich in food: it contains relatively intact fiber bundles composed of (not

directly) digestible cellulose fibers, adherent press juice and residual plant cells which have not been accessed under the influence of the pressing. Especially these residual plant cells with unrecovered cytosol still give fodder value to the press cake, which is generally dried and, pelleted or
5 otherwise, is used as relatively low-grade (roughage) component in fodders, in particular for ruminants.

For mechanically accessing, for instance, grasses, traditionally a method is used which is based on the disintegration of the vegetable raw material by means of hammer mills followed by squeezing the
10 disintegrated raw material (here designated as pulp) using screw presses or belt presses. The pulp is thereby separated into a press cake fraction and a press juice fraction. The juice fraction is regarded as the fraction in which the industrially recoverable content substances from the plant material are contained. Hammer mills typically consist of a rotor on which
15 fixed of freely movable elements are disposed which upon rotation of the rotor are brought into contact with the vegetable raw material and disintegrate it through force of impact. The disintegratory effect of hammer mills is relatively great when the vegetable material has a good turgor, i.e. when the plant cells are under tension. In that case, the force of
20 impact causes the tissue to snap and causes the cell content constituents to be liberated with the tissue fluid. If turgor is low, beating the plant material will cause it to be compressed. The tissue then remains more or less intact and the result is that the cell content becomes available to a much lesser extent. This has major consequences for the recoverability of
25 particularly those cell content constituents that are present in the vegetable biomass only partly in dissolved form and for another part in the form of solid, undissolved matter. This holds true inter alia for vegetable proteins, but also for lipids and pigments, and it will be understood that this will not be different for recombinant products. Also
30 known (for instance from US 5,464,160) are hammer mills where relatively dry material is separated into two fractions, this while neglecting the so valuable juice stream with protein-rich cytosol.

In the above-described methods of pressing vegetable material, it is generally of importance that the material be processed while still as fresh as possible, shortly after harvesting. Only then are the plant cells sufficiently under tension to be able to burst or snap under pressure so that the cytosol is liberated. When, after harvesting, already some time has elapsed before the plant parts are pressed, they are already dried out to some extent by then, the plant cells present have lost a large part of the necessary turgor and are too slack to be able to snap or burst under pressure. Accordingly, in non-fresh material, the recovery of press juice will proceed with even less efficiency. The same holds for material stemming from plants which, even before they were harvested, already lost a large part of the turgor in their plant cells through drying out and/or maturation. In general, such plants are not (completely) green anymore but acquire brown or yellow aspects. Lignified plant parts are altogether ineligible for the above methods, since most cells have died off in them, or in any case they contain only a very minor cytosol fraction and hence do not contribute to the recovery of high-grade food.

In general, plant material is separated into a (press) cake fraction (pulp) and a (press) juice fraction (serum). Characteristic of this method is the only partial extraction (along with the press juice) of the cell content constituents (vacuole content and cytoplasm with cell organelles present therein, such as chloroplasts and cell nuclei); the cell walls are substantially completely left behind in the press cake together with the remainder of the cell content. Contained in the press cake are all tissues which are also contained in the raw material, and in addition also a part of the cell content. The color of the fresh press cake is predominantly green or yellow in that the chloroplasts having therein the chlorophyll (leaf green) present, have only been partly removed with the press juice. The plant material has only partly disintegrated down to tissue level; this means that still recognizable fragments of leaves and stems are present in addition to individual tissues such as isolated vascular bundles.

The press juice consists substantially of the aqueous content of cells: the vacuole content and the cytoplasm having therein cell organelles such as chloroplasts in intact or disintegrated form; cell wall constituents are substantially absent in that they remain behind in the press cake.

5 Consequently, the recoverability of protein and other partly soluble substances in the traditional method of fractionation is highly susceptible to variations in the nature of the vegetable biomass, in particular the presence of turgor, which is typically reflected in differences in dry matter content.

10 The traditional method of fractionation has as a consequence that upon squeezing the pulp, only a part of the cell content constituents end up in the juice stream and another part remains behind in the press cake. Accordingly, the press cake still contains, in addition to the greater part of the cell walls, a part of the cell content constituents and, by virtue of that,
15 is used as fodder.

 The existing pressing methods for separating high-grade from low-grade components from vegetable material are thus relatively strongly dependent on the turgor of the cells present in the vegetable material, which limits the application of these methods to their application to
20 relatively fresh and green material. The existing methods are therefore not very suitable for recovering high-grade components from genetically modified plants with efficiency. Often, the resultant press cake, also when fresh and/or green material is used, still contains large amounts of unaccessed plant cells with high-grade cytosol in them, while only a low
25 price can be obtained for press cake since it is in fact suitable only as a relatively low-grade component of fodder. The existing classic methods could also, in principle, be applicable to genetically modified plants which have specifically been modified such that precisely their parts such as seeds, tubers, roots or fruits are rich in, for instance, the desired
30 recombinant proteins, peptides, amino acids, oils and carbohydrates. However, traditional pressing methods, such as known, for instance, in grasses, are incapable of complete separation of juice and fiber fractions. A

diffusion process as described in relation to the processing of sugar beet also has major disadvantages. It requires so much water and energy that the recovery of the desired raw material, if possible at all, would become very expensive. In particular now that genetically modified sugar beet and
5 other tuberous and/or root plants will increasingly often be grown as a crop, there is a need for better recovery methods, which can then be used as well in unmodified crops. Also, specific localization of the component to be recovered requires more than the modification of a gene alone. In most cases, it will then be necessary to modify the plant, such that besides
10 producing the desired product, the plant also has the modified systems to store the desired products in those specific parts. The molecular-biological knowledge of the systems involved in the storage is at this point generally insufficient for manipulation of the storage of the product as well, such that the desired result is achieved. Tissue-specific expression of
15 recombinant genes is still in its infancy. In general, it may be expected that the desired product will also, and chiefly so, be found in the leaf and/or stem parts of the modified plant.

For recovering high-grade components from genetically modified and unmodified plants, such as, for instance, from leaf and/or stem parts,
20 roots or tubers, there is a need for better methods which can access the plant cell with a higher efficiency than do the existing methods, can make the cytosol fraction more available for recovery, and affords better marketing possibilities for the fiber-containing residual material. The object of the invention is to provide for this need.

25 The invention provides a method for separation of components from material of a plant, characterized in that the material is at the least partly fiberized and subsequently is separated into a fiber fraction and a juice stream, such that the fiber fraction chiefly comprises relatively firm
30 tissues such as epidermis, sclerenchyma and vascular bundles, and the juice stream chiefly contains soft tissues such as parenchyma and cytosol. In a preferred embodiment, the invention provides a method for

separating a juice stream comprising in particular chloroplasts, however, also that parenchyma that particularly comprises other plastids, such as amyloplasts, elaioplasts and chromoplasts is easy to separate from the fiber fraction. The invention provides a new method of fractionation, which consists of at least two steps: a first step in which the vegetable material is fiberized through the action of shear forces and a second step in which the fiber fraction is separated from the rest.

The method according to the invention is applicable to all fiber containing vegetable materials, originating both from cultivated plants (crop plants) and from wild plants, as well as to crossing products.

A method according to the invention is applicable to vegetable material, which may or may not be genetically modified, chiefly comprising leaf and/or stem parts, such as vegetable biomass originating from cultivated grassland, feed crops such as forage grasses and maize, lucerne, clover, and other papilionaceous plants, fiber crops such as flax and hemp, and the tops of crops normally grown solely for their seeds, fruits or tubers, such as grains, beets, peas, beans, potatoes, carrots, cassava, sweet potato. The method according to the invention is also applicable to the processing of conventional seeds, fruits or tubers, such as grains, sugar beet, Jerusalem artichoke, beets, peas, beans, potatoes, carrots, cassava, sweet potato, and to genetically modified plants which have specifically been modified, such that precisely their parts such as seeds, tubers, roots or fruits are rich in, for instance, the desired recombinant proteins, peptides, amino acids, oils and carbohydrates.

Fractionation of vegetable biomass means the separation into a number of fractions. By fractionating biomass, new product streams are formed with other application possibilities than the raw material itself. Consequently, these new product streams jointly often represent more value than the original biomass. The invention provides a new technique which is based on fiberization and subsequent defibration of vegetable biomass.

In a preferred embodiment, the invention provides a method for separation of components from vegetable material, characterized in that the material is at the least partly mechanically fiberized and subsequently is separated into a fiber fraction and a juice stream, with the fiber fraction (see, for instance, Figs. 1 and 2, also for a comparison with a traditional method) principally comprising relatively firm tissues such as epidermis, sclerenchyma and vascular bundles, and the juice stream (see, for instance, Figs. 6 and 7, also for a comparison with a traditional method) principally containing soft tissues such as parenchyma and cytosol. The mechanical fiberization is effected, for instance, through treatment of the material in a blender. Preferably, certainly when application on an industrial scale is desired, the fiberization is done, according to the invention, with an apparatus such as a (pressure) refiner, with grinding disks, such as employed in the pulp and paper industry, or in an apparatus of equivalent action by which the vegetable material can be fiberized to enable separation into a fiber fraction which principally comprises relatively firm tissues such as epidermis, sclerenchyma and vascular bundles, and the juice stream principally comprising soft tissues such as parenchyma and cytosol. In fiberization, the vascular tissue with the sclerenchyma and the epidermis (jointly the fiber fraction) is mechanically dissociated from the other, substantially parenchymal tissue. This parenchymal tissue is at the same time accessed and the cell content constituents therefrom (cytosol and parenchyma) thereby become available substantially completely. Fiberization can be done using refiners such as they are in use in the pulp and paper industry for fiberizing wood and wood pulp. Refining, in this case fiberization, typically occurs with addition of moisture to the plant material. The result is then a slurry of fiberized material from which the fibers can be removed. The fiber fraction (fiber stream) which is thus recovered, is suitable, through its nature and composition, inter alia for the following applications: as raw material for paper and cardboard (solid cardboard, folding cardboard and form cardboard), as raw material for the production of fiberboard materials

(softboard, hardboard, chipboard, MDF, HDF and MDF/HDF form parts) and composites, as raw material for moisture absorbing materials, such as diapers, sanitary napkins, and so forth, as raw material for the preparation of growth media (potting compost and substrates), mulches
5 (as protection against erosion, and as weed and disease suppressant), as soil improver or as fuel.

In defibration, the liberated fiber is separated, for instance through screening, from the other plant constituents. Through washing and screening, the fiber can be further purified and as many non-fiber
10 constituents as possible can still be recovered with the washing water. The defibered slurry then consists of a mixture of added water, tissue fluid, cell content constituents and finely dispersed cell walls coming from the parenchymal tissue. From the defibered slurry or juice stream, content substances can be recovered in a more or less pure form, such as:
15 (recombinant) proteins, peptides and (high-grade) amino acids, vaccines, antibiotics or other factors important in medicine, enzymes, pigments, lipids, fatty acids, starches, soluble sugars and (cell wall) carbohydrates for use in livestock feeding, human nourishment, or as substrate for fermentations, or, through concentration, fodder or food products can be
20 made with a high nutritive value as a result of the presence of high-grade proteins, peptides, amino acids or other components and/or as a result of the removal of the non-digestible or poorly digestible fiber fraction.

The defibered slurry can be further fractionated in subsequent steps. One possibility is, for instance, the separation of all solid parts
25 through centrifugation, which may or may not be preceded by a coagulation step through heating, acidification or otherwise. Another possibility is to convert the parenchymal cell walls into soluble sugars using cell wall splitting enzymes (pectinases, cellulases, etc.) and thus adding them to the fraction of dissolved substance in the defibered slurry.

30 Characteristic of the method as envisaged by the invention is the split at tissue level into a fiber fraction which contains the relatively firm tissues (vascular bundles, sclerenchyma and epidermis) and a defibered

fraction which contains the relatively soft tissues (parenchyma) with their content. Briefly summarized, the difference between the traditional and novel method is the extraction of tissue fluid (traditional) versus tissue fractionation (new method). The new method provides for the recovery of components from plants with a high efficiency, whereas in a traditional method large amounts of high-grade component remain behind in, for instance, the pressed material, or a very high energy demand is entailed.

Eligible for processing according to a method provided by the invention are, in particular, also genetically modified crop plants, where the plant has been so altered as to preferentially express one or more components in, for instance, the cytosol or in a cell organelle. Also in genetically modified plants (and in particular in those where the accumulation of a (recombinant) high-grade component as obtained by the genetic manipulation is spread through several parts of the plant), proper accessing of the plant cell and its content is of great importance, so that a product obtained through modern biotechnological manipulation of such a cultivation crop can be recovered with the highest possible efficiency. The application of a method according to the invention for instance makes it possible to also utilize with a high efficiency genetically modified plants where the component which, through the genetic modification, has increased in quantity or is present *de novo*, such as a vaccine, an antibiotic or another factor which is important in (veterinary) medicine, or (recombinant) high-grade proteins, peptides or amino acids, is proportionally present in the parenchyma of all leaf, stem and/or root or tuber parts, owing to the virtually complete recovery of the plastids, such as chloroplasts, amyloplasts, elaioplasts and chromoplasts, present in the parenchyma, readily separable from the fiber fraction by the use of a method according to the invention.

The invention also provides for the separation of components from root and/or tuber parts of crops which may or may not be genetically modified, such as sugar beet. In an embodiment of a method according to the invention, washed sugar beets are metered in pre-chopped or pre-cut

form into a refiner. During this process step, the tuberous tissue is fiberized into a pulp. After the fiberization step, the fiber fraction is separated from the juice stream, for instance through screening, filtration or centrifugation, and the solid fraction is optionally washed with water to recover the components which can still be dissolved therein. The liquid fraction or juice stream can be further processed after centrifugation, to recover the sugars in the manner conventional in the sugar industry (carbonation, concentration, crystallization, centrifugation, etc.). By the use of the method according to the invention, the conventional diffusion step is not necessary anymore. Not 1100 liters of water are recovered, but an already highly concentrated juice stream is the result. Besides a direct saving of cost as a result of the elimination of the diffusion step, the concentration of the sugar in the serum or juice stream will be higher than that in the stream of the diffusion step. Moreover, the elimination of the diffusion step will mean a saving of the total amount of water required, with an inherent saving of evaporation and drying costs. By following a method according to the invention, the sugar loss (normally about 2%) will be greatly reduced in that the total amount of sugar present in the beet remains behind in the serum. Also, owing to the fiberization, the fiber fraction of the sugar beet is better digestible than the conventional pulp, when used as ingredient of fodders. Also for genetically modified beets, such as, for instance, beets having an increased fructose-oligosaccharide content or an increased amino acid synthesis, the processing is preferably done as provided by the invention.

The invention also provides an apparatus for practicing a method according to the invention. Such an apparatus is characterized by means suitable for the fiberization according to the invention, whereby the relatively firm vascular tissue with, for instance, the sclerenchyma and the epidermis (jointly the fiber fraction) is mechanically dissociated from the other, substantially parenchymal tissue. This parenchymal tissue is at the same time accessed and the cell content constituents therefrom (cytosol and parenchyma) thereby become available substantially

completely. 'Fiberization' is herein understood to mean that the plant material is exposed to such forces that the relatively firm tissues are dissociated virtually completely from the relatively soft tissues. As a resultant of the forces which effect this fiberization, the great majority, if not virtually all, of the plant cells will be accessed, so that the cytosol is liberated. This cytosol, as a juice stream generally also including residues of the organelles and the cell surrounding lipid membrane and parenchymal cell walls, can be relatively simply separated from the fiber component through screening or through other separation means known to one skilled in the art.

A first advantage of the invention is that the efficiency of the method is not dependent on the turgor of the plant cells present in the material, so that the plant cells can be accessed with greater efficiency than is conventional in the above-described pressing methods.

A second advantage of the invention is that the invention provides two product streams which as such are very pure. A first one, the fiber fraction, contains principally cellulose and hemicellulose, principally consisting of the elements C, H and O (which in itself yields advantages for a clean combustion); a second one contains all valuable and complex content substances and, for instance, the recombinant component(s) which are to be found in the parenchyma and cytosol, and which can be further separated relatively simply.

The two product streams can be separated from each other by, for instance, screening. Other separation methods are also conceivable, for instance centrifugation, processing by (hydro)cyclone and centriscreening, and decanting or sedimentation, or combinations of these methods. In defibration, the liberated fiber is separated from the other plant constituents through, for instance, screening. By washing and screening, the fiber can be further purified and as many non-fiber constituents as possible can still be recovered with the washing water. The defibered slurry then consists of a mixture of added water, tissue fluid, cell content

constituents and finely dispersed cell walls coming from the parenchymal tissue.

A first product stream as contemplated by the invention is a (generally high-grade) juice stream consisting of an aqueous solution/suspension of virtually all high-grade (recombinant) components or nutrients from the vegetable material (such as sugars, proteins, lipids, pigments, and the like). Through removal of the (nutritionally low-grade) cell wall fiber components, there is formed (on a dry matter basis) this relatively high-grade product stream, from which the various components can be further isolated relatively simply. The defibred product or the juice stream consists substantially of parenchyma, partly as intact cells, partly as disintegrated cell material. The color of the defibred product is typically green due to the presence of intact or broken chloroplasts, sometimes brown-green through browning during the fractionation. Macroscopically, it is a liquid. Microscopically, principally intact and disintegrated parenchyma cells and cell organelles such as chloroplasts are visible in this liquid.

The juice stream of such genetically modified plant materials according to the invention is further treated, for instance through screening, whereafter for instance the (recombinant) protein, peptides, amino acids, and other (recombinant) components in the juice are recovered by, for instance, coagulation through, for instance, acid and/or heat treatment. The juice stream can also be further treated through (ultra or membrane) filtration, drying, fermentation, or other methods known to those skilled in the art. Protein-rich or otherwise high-grade nutrients for human and animal consumption, but also pigments such as carotene (provitamin A), and specific recombinant products, can be recovered in this way from cytosol, also from that of leaf and/or stem parts.

The second product stream, the fiber fraction as provided by the invention, consists of the relatively hard tissues. These are typically the vascular bundles, the sclerenchyma and the epidermis. The cell content is absent from these tissues or is removed virtually completely during

fractionation and washing. Consequently, fiber consists predominantly of cell wall components. Chloroplasts are virtually absent in a pure fiber preparation. The color of the washed fiber typically varies from white to yellow or light-brown. Sometimes, a light-green color may arise as a result of impregnation with chlorophyll during recovery. Macroscopically, the fiber fraction has a fiber structure chiefly due to the filamentary character of the vascular bundles. Microscopically, in addition to the filamentary structures of vascular bundles and sclerenchyma, typically, pieces of epidermis tissue are also recognizable, consisting of sheets one cell layer thick. The vascular bundles are built up from several cells including wood vessels and sieve tubes. Depending on the extent of fiberization, fibers consisting of one cell occur too, and further the residues of cell walls and (spiral, reticulate or ring-shaped) cell wall thickenings. Typical of the epidermis sheets is the presence of stomata and silicious teeth or hairs.

The fiber stream as contemplated by the invention consists substantially exclusively of a wet solid fiber stream (chiefly cellulose and hemicellulose) basically having no nutritive value since this fraction is not directly, and microbiologically only to a slight extent, digestible. However, the absence of digestibility makes it possible to use the fiber stream for non-food applications, this in contrast to, for instance, the press cake coming from the above-described traditional pressing methods where the press cake is in fact suitable only for fodder applications and would soon rot if it were not prepared into food and was eaten.

For example, the invention provides the use of a fiber fraction for the production of energy. The fiber fraction contains principally the carbohydrates cellulose and hemicellulose (composed principally of the elements C, H and O), which are eminently combustible and hence can be converted with a high efficiency to useful energy in, for instance, a combined heating and power station, and which may be expected to entail no or minor emission of harmful substances upon combustion. Processing plant material according to a method as contemplated by the invention, followed by the use of the resultant fiber fraction as fuel, will contribute to

the reduction of the CO₂ emission, since what is involved here is a non-fossil fuel. Also, as such, the combustion of the fiber fraction will be cleaner for the environment, since the fiber fraction is hardly, if at all, contaminated with the salt residues (such as K, Na, Cl, P compounds) and protein residues (which incorporate S and N compounds) normally occurring in dry plants. These salt residues and protein residues, coming from the cytosol, have been separated, along with the juice stream, from the fiber fraction. Combustion of the fiber fraction (having therein principally C, H and O compounds which are converted by combustion to H₂O and CO₂) will therefore entail a much lesser environmental impact than combustion of other plant material in which all these salt residues and protein residues are still present. Protein combustion contributes in particular to the emission of sulfur and nitrogen compounds such as sulfur and nitrogen oxides, and incombustible salt residues will contribute to the residual ash volume. Upon combustion of a fiber fraction according to the invention, the emission of, for instance, sulfur and nitrogen oxides, and the residual ash volume having therein the salt residues will be much smaller.

Since the fiber material is of organic origin, it is also applicable, for instance, as a peat substitute in, for instance, potting soil or in horticultural substrates.

In a preferred embodiment of the invention, the plant material is fiberized to such an extent that, for instance, the fiber material consists principally of elemental fibers, so that the so obtained fiber component or fiber stream is suitable, for instance, for further processing into cardboard and/or paper, or can be used as (natural) fiber in composites together with and in reinforcement of (artificial) resins.

Examples of vegetable material that can be treated with a method according to the invention are genetically modified (fodder) crops such as grasses (grains such as wheat, rye and maize included), lucerne, but also harvest residues of crops whose leaf and/or stem parts are normally not processed, such as potato or (sugar) beet tops which are generally left

behind in the field upon harvesting. The high efficiency of a method according to the invention renders the processing of such vegetable materials profitable.

The invention further provides a method for separating components from vegetable material which has been harvested a relatively long time ago and has already, at least partly, dried out, or which can no longer be qualified as fresh and green, but has acquired a more woody and/or dry character for instance through maturation. Such material is not suitable for processing in a pressing method, but is now eminently processable, since the extent of turgor of the plant cell to be accessed is not important when a method according to the invention is used.

The invention provides a refiner, or an apparatus of comparable action, and the use of such an apparatus, for instance for separating components from vegetable material which does not (yet) exhibit any lignification, or exhibits only a minor extent of lignification, and in which parenchyma is present. This parenchyma with the cytosol present therein is the basis of the juice stream as contemplated by the invention. A refiner is generally used to break down wood chips into fibers for the purpose of making pulp for the production of paper and/or cardboard. The invention provides the processing of a genetically modified crop by means of a refiner. Refiners are generally not used for fresh and/or green material, since wood consists principally of dead or lignified tissue from which most parenchyma, with chloroplasts, has disappeared. Different types of refiners are known to those skilled in the art. There are, for instance, refiners with conical disks or with flat disks. The invention provides the use of both types, and/or equivalent apparatuses, for instance convex/concave type composite grinding disks, in a method provided by the invention.

The invention will now be further explained in the experimental section of the description, without limiting it.

Experimental section

Experimentally, the invention was compared with the traditional technique. This was done using a lab(oratory) protocol and industrial equipment. On the basis of that, the nature of the fiber fraction can be assessed and the recoverability of content substances in the two methods can be compared. Results shown hereinbelow illustrate the difference in the recoverability of protein and other content substances.

Traditional method

In the experiments on a laboratory scale, the traditional method of grinding and pressing was simulated by pulping material in a Tecator Homogenizer and squeezing the pulp using an adapted draw pressure bench of Lloyd Instruments. It was provided with a cup having a perforated bottom plate (surface 50 cm²) in which 100 g of fresh pulp were pressed for 15 minutes at a pressure running up to 10 bar. The original material and the press juice were analyzed for nitrogen content, and the recoverability of protein was calculated as the amount of crude protein (amount of nitrogen multiplied by 6.25) in juice expressed as a percentage of the amount of crude protein in the original material.

On a larger scale, a hammer mill of the type Jenz A30 was employed to disintegrate grass and the thus obtained grass pulp was squeezed in a Vetter screw press with a compression ratio of 1:7.65 and a perforation of the cylinder wall of 0.7 mm. By passing plant material through the hammer mill a single time or several times, the material could be disintegrated to a greater or lesser extent.

New method

In the experiments on a laboratory scale, the new method was simulated by fine-chopping fresh grass in a cutter, then mixing 30 g of fine-cut grass pieces with 400 ml of water, and fiberizing same in a blender for 10 minutes, screening the slurry from the blender on an 850 micron screen,

and washing and drying the screened-off fiber fraction. The fiber was analyzed for contents of nitrogen, ash and cell walls and thus the composition of the defibered slurry was calculated. The fiber yield was determined as the amount of dry matter in the fiber fraction as a

5 percentage of the amount of dry matter in the starting material. The recoverability of protein was calculated as the amount of crude protein in the defibered slurry expressed as a percentage of the amount of crude protein in the original material.

10 The new method was also tested with a Sprout-Waldron 12 inch pressure refiner, with grinding disks of the type D2A505. Refining or fiberizing fresh grass was done under atmospheric conditions at a disk distance of 0.04 mm, with addition of water to a consistency of about 2% dry matter. The fiber was then screened on a screen with 140 micron openings.

15 The new method was also tested on a semitechnical scale using a Sunds Disk Refiner type RO 20 FLUFF serial no. 3838, year of manufacture 1985, provided with grinding disks with a high or low resistance to throughput. With this refiner, inter alia the effect of disk type and disk
20 distance on throughput and fiber composition was investigated.

Refining occurred under atmospheric conditions with chopped grass, with or without addition of water. The fiberization of potato tops was also tested.

25 The grass originated from both cultivated grassland and natural grounds and was processed in fresh, chopped form. Samples of the fiberized material were rinsed by hand and screened and analyzed for nitrogen and ash content. The recoverability of crude protein was calculated on the
30 basis of an average fiber proportion of 33% of the grass dry matter.

The potato tops originated from starch potato plants during the full growth phase of the potato plant. The tops were pulled mechanically and were consequently crushed to some extent. The potato tops consisted of stems and leaves. The potato tops, without prior washing, were processed
5 with the refiner while fresh, without addition of water. The fiberized material was squeezed out by hand.

10 Experimental results:

Description of the figures

Figure 1 and Figure 2 (detail)

15 Press cake of grass (left) and grass fiber (right) stemming from perennial ryegrass (*Lolium perenne*).

In the press cake, the green color due to the presence of chloroplasts is conspicuous. Also, leaf fragments are recognizable by their size (cross section greater than 1 mm) and the characteristic ribs on the top of the
20 leaf. The grass fiber is distinguished by the light color (virtually complete absence of chloroplasts), the filamentary structure and the small diameter of the individual fibers (in this case very much smaller than 1 mm). The distance between successive numbers is 1 cm.

25 Figure 3

Suspension of grass fiber from perennial ryegrass (*Lolium perenne*).

Visible are fibrous structures (vascular bundles) of a diameter of a few
30 tens of micrometers and epidermis sheets of a smallest diameter of up to a few hundreds of micrometers.

Figure 4

Microscopic recording of epidermis in grass fiber originating from perennial ryegrass (*Lolium perenne*).

- 5 Characteristic is the presence of stomata in perennial ryegrass, concentrated in the epidermis of the top of the leaf. The more compact tissue on the side of the stomata is underlying sclerenchyma. The elongate epidermis cells have a cross section of about 20 micrometers.

10 **Figure 5**

Microscopic recording of vascular bundles in grass fiber originating from perennial ryegrass (*Lolium perenne*).

- 15 Characteristic of vascular bundles are their being built up from several cells and the presence of vessels with reticulate thickenings. The diameter of the fiber in the middle of the figure is about 50 micrometers.

Figure 6

- 20 Microscopic recording of parenchyma cells in the juice stream of defibered grass originating from perennial ryegrass (*Lolium perenne*). This juice stream belongs to the fiber fraction of Figures 1 and 2.

- Characteristic of parenchyma cells in grass leaves is the abundant presence of chloroplasts. Some parenchyma cells, however, have been broken during fractionation: only the cell wall is still visible, the
25 chloroplasts occur in isolation in the surrounding fluid. The size of these parenchymal cells is about 20 * 40 micrometers. The fraction shown in this figure was diluted prior to being photographed to bring out the relatively large amount of parenchyma cells in the juice stream according to the invention.

Figure 7

Microscopic recording of parenchyma cells in press juice from grass originating from perennial ryegrass (*Lolium perenne*).

- 5 This press juice belongs to the press cake of Figures 1 and 2. The fraction shown in this figure was concentrated prior to being photographed to bring out the relatively small amount of parenchyma cells in the press juice.

Figure 8

- 10 Process diagram for fiberizing or refining grass.

Figure 9

Process diagram for fiberizing or refining grass.

- 15 Figure 10

Process diagram for fiberizing or refining grass.

Fiberization

Table 1. Fiber composition and fiber yield of cultivated grasses, by species and variety, on average during the season, and of a few other crops.

5

Species/variety	Nitrogen content (g/kg dm ^{**})	Ash content (g/kg dm)	Cel wall content (g/kg dm)	Fiber yield % of dry matter in raw material
Grasses				
<i>Lolium perenne</i> 4n Vr.*	4.0	50.6	867	28
<i>Lolium perenne</i> 2n Vr.	4.3	43.5	865	34
<i>Lolium perenne</i> 4n Lt.	4.5	41.1	879	29
<i>Lolium perenne</i> 2n Lt.	5.4	34.7	857	29
<i>Lolium multiflorum</i> 4n	3.8	47.4	877	24
<i>Lolium multiflorum</i> 2n	4.4	36.6	880	27
<i>Phleum pratense</i>	4.3	39.8	862	30
<i>Festuca arundinacea</i>	4.4	36.7	867	29
<i>Dactylis glomerata</i>	5.1	42.0	873	32
<i>Festuca pratensis</i>	4.5	44.2	872	32
Other plant materials				
Lucerne	5.7	18.9	824	28
Potato tops young	4.2	26.1	836	16
Potato tops old	3.7	50.7	714	21
Pea tops	4.8	25.7	832	29
Beet tops	12.0	79.7	680	9

*) 4n = tetraploid; 2n = diploid;

Vr. = early-flowering; Lt. = late-flowering

10 **) dm: dry matter

Fiberizing vegetable biomass yields a fiber fraction which, depending on the nature of the material, can vary from less than 10% to more than 30% of the dry matter. The exact number is also dependent on the mesh of the screen with which the fiber is separated and the intensity of washing. The fiber fraction in the case of *Lolium perenne* typically consists for more than 80% of cell wall material and has a nitrogen content mostly lower than 6-8 g per kg of dry matter and an ash content mostly lower than 50-100 g per kg of dry matter.

Table 2. Composition of fiber

		refiner	lab protocol
Ash	(g/kg d.m.)	22.3	26.0
Nitrogen	(g/kg d.m.)	5.3	4.4
Cell walls	(g/kg d.m.)	808	792

The composition of the fiber fraction is comparable for the experiments with the refiner and the experiments according to the lab protocol.

Defibration

Table 3. Composition of grass and of the defibered grass slurry.

		Grass	Defibered slurry	
			refiner	lab protocol
Ash	(g/kg d.m.)	92.6	138	139
Nitrogen	(g/kg d.m.)	31.0	47.4	48.7
Cell walls	(g/kg d.m.)	544	375	438

In addition to the cell content constituents (such as protein), the defibered slurry also contains a part of the cell walls from the plant material. These are substantially the cell walls from the soft parenchymal tissue which

disintegrate upon fiberization and subsequently, in defibration, pass the screen as finely dispersed material. The amount present in the defibered slurry is partly dependent on the diameter of the screen orifices.

- 5 Table 4. Recoverability of crude protein from cultivated grasses, by species and variety, on average during the season, and of a few other plant materials, upon grinding+pressing and upon defibration.

Species/variety	Grinding+pressing (%)	Defibration (%)
Grasses		
<i>Lolium perenne</i> 4n Vr.	30	95
<i>Lolium perenne</i> 2n Vr.	23	94
<i>Lolium perenne</i> 4n Lt.	22	95
<i>Lolium perenne</i> 2n Lt	16	94
<i>Lolium multiflorum</i> 4n	41	96
<i>Lolium multiflorum</i> 2n	35	95
<i>Phleum pratense</i>	11	94
<i>Festuca arundinacea</i>	21	94
<i>Dactylis glomerata</i>	31	93
<i>Festuca pratensis</i>	17	94
Other materials		
Lucerne	52	95
Potato tops young	51	98
Potato tops old	42	95
Pea tops	16	95
Beet tops	24	95

10

Defibration yields a slurry mostly containing more than 70%, and preferably more than 80% or 90%, of all crude protein from the vegetable material. This protein can be recovered from it by centrifugation, which may or may not be preceded by heat coagulation.

In the traditional method of fractionation, the recoverability of crude protein is mostly less than 50%.

- 5 Table 5. Comparison of protein recoverability from grass upon repeated passage through hammer mill followed by squeezing in a screw press, and upon fiberization according to the invention.

10		Protein recoverability (%)
	Hammer mill+screw press	
	Passages through hammer mill	
15	1x	28
	2x	30
	4x	35
	8x	43
20	Fiberization	93-96
	according to the invention	

- Even upon repeated disintegration of grass in a hammer mill followed by squeezing in a screw press, the protein recoverability was found to be less
- 25 than half of the protein recoverability measured upon fiberization of grass.

Process diagrams for refining underground parts of crops such as tubers and roots.

Washed sugar beets are metered in pre-chopped or pre-cut form into a
5 refiner. During this process step, the tuberous tissue is fiberized into a
pulp. After the fiberization step, the fiber fraction is separated from the
juice stream, for instance through screening, filtration or centrifugation,
and the solid fraction is optionally washed with water to recover the
components which can still be dissolved therein. The liquid fraction or
10 juice stream can be further processed after centrifugation, to recover the
sugars in the manner conventional in the sugar industry (carbonation,
concentration, crystallization, centrifugation, etc.). By the use of the
method according to the invention, the conventional diffusion step is not
necessary anymore. Not 1100 liters of water are recovered, but an already
15 highly concentrated juice stream is the result. Besides a direct saving of
cost as a result of the elimination of the diffusion step, the concentration of
the sugar in the serum or juice stream will be higher than that in the
stream of the diffusion step. Moreover, the elimination of the diffusion
step will mean a saving of the total amount of water required, with an
20 inherent saving of evaporation and drying costs. By following a method
according to the invention, the sugar loss (normally about 2%) will be
greatly reduced in that the total amount of sugar present in the beet
remains behind in the serum. Also, owing to the fiberization, the fiber
fraction of the sugar beet is better digestible than the conventional pulp,
25 when used as ingredient of fodders.

The results of the tests with the Sunds Disk Refiner are summarized in
Table 6.

Choice of plate type and disk distance determine the extent of fiberization
30 but determine protein recoverability only to a slight extent. A high
throughput was possible in combination with a high protein recoverability

(in this case >85%) both with protein-rich cultivated grass and with protein-low natural grass.

5 Potato tops are well processable with the refiner. In the fiber fraction the content of woody fibers is relatively high because the original potato tops consisted not only of leaf tissue but also of stem tissue. The high ash content in the fibers of the potato tops was caused to an important extent by the high sand content in the tops due to not washing the raw material.

10

Table 6. Fiber composition and protein recoverability upon accessing grass and potato tops on a semitechnical scale using a Sands Disk Refiner.

Raw material	composition raw material			disk		through-put (kg d.m./hour)	composition fiber		protein recoverability
	d.m.	ash	N	Plate resistance	disk distance		ash	N	
	(g/kg fresh)	(g/kg d.m.)	(g/kg d.m.)		mm	(kg d.m./hour)	(g/kg d.m.)	(g/kg d.m.)	(%)
cultivat. grass	154	91	19.3	high	0.4	-	13	5	91
cultivat. grass	142	183	36.1	high	0.10	39	31	14	87
"	"	"	"	high	0.50	55	27	15	86
"	"	"	"	high	1.00	104	38	15	86
"	"	"	"	low	0.05	157	49	14	87
"	"	"	"	low	0.10	135	41	14	87
"	"	"	"	low	0.50	139	54	15	86
"	"	"	"	low	1.00	211	82	20	82
natural grass	215	138	12.1	low	0.10	-	41	6	84
potato tops	104	342	23.5	high	0.20	-	473	15.2	-
"	119	344	27.0	low	0.20	-	374	19.0	-

Process diagrams for refining crops having chiefly leaf and/or stem parts, such as grass.

5

Pretreatment

The appended process diagrams (see Figures 8 to 10) start from the supply of chopped grass as is also conventional in the processing of grass and
10 lucerne in herbage dryers. Normally, the chopping length is in the order of magnitude of a few centimeters, but it can also be longer or shorter. For the refiner test, fresh grass was pre-comminuted in a Pierret guillotine cutter to 6 mm particle length, in other words, very short. Presumably, such a short
length is not requisite; refining or fiberizing pressed grass (of a particle
15 length of presumably a few centimeters) did not present any problems.

Washing

A washing step will probably be necessary in practice to remove sand and
20 thereby reduce equipment wear and enable a cleaner product yield. This washing step, however, may be skipped if sand and other contaminants are not present.

Sulfite addition

25

Addition of sulfite may be necessary, but need not be so, to prevent undesirable complexing between proteins and polyphenols. On the basis of past experiences regarding the processing of grass sap, it is known that such complex formation reduces the nutritive values of grass proteins. The
30 circumstances during refining, however, may be different. A rapid

temperature rise during refining may instantly stop enzymatic activity (blanching effect) and inhibit formation of polyphenols.

Refining: basic diagram (Fig. 8)

5

Refining grass is in principle possible with and without liquid addition during refining. In a first test, with fresh grass (15% dry matter), the process did not proceed readily without generous admixture of water to a dry matter percentage of about 2%. The necessity of liquid addition is
10 probably partly dependent on the type of refiner and the nature of the grass (fibrousness). Squeezed grass (26% dry matter) could be refined without water addition. If, and if so, how much water is admixed, has consequences for the temperature rise during refining, and therefore for the extent of protein denaturation and hence for the subsequent steps in the process.

15

The basic diagram includes, after refining, the process steps: screening out the fiber, heat coagulating the refiner liquid followed by separation of the protein cake by means of a decanter and evaporation of the deproteinized liquid. Two extreme variants of this basic diagram are conceivable: one with
20 a minimal addition of liquid during refining and one with ample addition of liquid. The basic diagram is then changed to variant A (Figure 9) and variant B (Figure 10), respectively.

Refining: variant A (Figure 9)

25

Upon minimal addition of return liquid, possibly a substantial temperature rise will occur during refining: in the test with squeezed grass to above 70°C. Protein coagulation and pasteurization will then occur already during refining and possibly a separate coagulation step may then be skipped. In

that case, the process diagram is simplified to refining - screening - decanting - evaporation: see variant A on basic diagram.

Refining: variant B (Figure 10)

5

Variant B: In case of ample addition of return liquid, the temperature rise during refining can remain limited: in the test with fresh grass to about 35° C. As a result, presumably, a part of the protein can remain in solution. In that case, after refining, two alternative routes are conceivable. The

10 simplest one is, after screening out the fiber, to heat-coagulate the liquid and decant. In that case, one protein cake is formed and a deproteinized liquid that can be evaporated (see the basic diagram). A more complex route (variant B) comprises, after screening out the fiber, initial decanting whereby a crude protein cake is obtained (crude, i.e. with admixture of
15 finely divided parenchymal cell walls that pass the screen), followed by heat-coagulation and decanting again. In this second decanting step, a purer protein cake is obtained.

Screening out the fibers

20

For the purpose of screening out the fibers, centriscreens can be employed, as known to those skilled in the art for separating potato fiber. In the test, an inclined screen was used, having stretched onto it a wire gauze with openings of 140 * 140 microns. On a lab scale, a screen with a hole diameter
25 of 850 and 250 microns was used. Experiences with it are that most fibers can be separated on a relatively coarse screen. The finer fiber fraction can be added to the total fiber fraction or, via enzymatic deliquescence, to the molasses, concentrate or juice stream.

Washing and drying of fiber

- The fiber that is separated by screening may be contaminated with dissolved and suspended substance. Accordingly, washing with
- 5 deproteinized return liquid is then necessary, followed by moisture removal through pressing/centrifugation and drying.

Drying protein cake

- 10 The protein-rich cake which is separated through decanting can be dried in the same manner as is known to those skilled in the art for, for instance, potato protein. In case of the presence of a relatively high lipid fraction, addition of an antioxidant product has an improving effect.
- 15 Evaporation of deproteinized liquid

The deproteinized liquid can be evaporated to form a sugar-rich syrup.

Extended procedure

- 20 The basic diagram can be expanded to include processes for the purpose of further refining the crude protein cake. One possible addition is enzymatic deliquescence of the parenchymal cell walls in the crude protein cake. The sugars which this yields can, for instance, be added to the molasses,
- 25 concentrate or juice stream.

CLAIMS

1. A method for separating components from vegetable material, characterized in that the material is at the least partly fiberized and subsequently is separated into a fiber fraction and a juice stream, such that the fiber fraction principally comprises relatively firm tissues such as
5 epidermis, sclerenchyma and vascular bundles, and the juice stream principally comprises soft tissues such as parenchyma and cytosol.
2. A method according to claim 1, wherein the juice stream comprises chloroplasts.
3. A method according to claim 1 or 2, wherein the material is
10 mechanically fiberized.
4. A method according to claim 3, wherein the material is fiberized by means of a refiner.
5. A method according to any one of claims 1-4, wherein the fiber fraction is separated from the juice stream by screening.
- 15 6. A method according to any one of claims 1-5, wherein the vegetable material originates from a genetically modified plant.
7. A method according to any one of claims 1-6, wherein the vegetable material at least originates from underground parts, such as roots or tubers, of a plant.
- 20 8. A method according to any one of claims 1-7, wherein the vegetable material originates from a cultivated crop.
9. A fiber fraction obtained through a method according to any one of claims 1-8.
10. Use of a fiber fraction according to claim 9.
- 25 11. Use of a fiber fraction according to claim 9 for the production of energy or for the production of cardboard and/or paper.
12. A juice stream obtained through a method according to any one of claims 1-8.

13. A juice stream according to claim 12 which contains more than 55%, preferably more than 75%, preferably more than 90% of the crude protein of the vegetable material.
14. Use of a juice stream according to claim 12 or 13.
- 5 15. Use of a juice stream according to claim 12 or 13 for the production of food.
16. Use of a juice stream according to claim 12 or 13 for the recovery or purification of at least a content substance.
17. Use of a juice stream according to claim 16 for the recovery of a
- 10 carbohydrate, such as starch or sugar.
18. Use of a juice stream according to claim 12 or 13 for the recovery or purification of recombinant products.
19. An apparatus for carrying out a method according to any one of claims 1-8.
- 15 20. An apparatus according to claim 18 which comprises at least a refiner.
21. An apparatus in which a method according to any one of claims 1-8 is carried out.

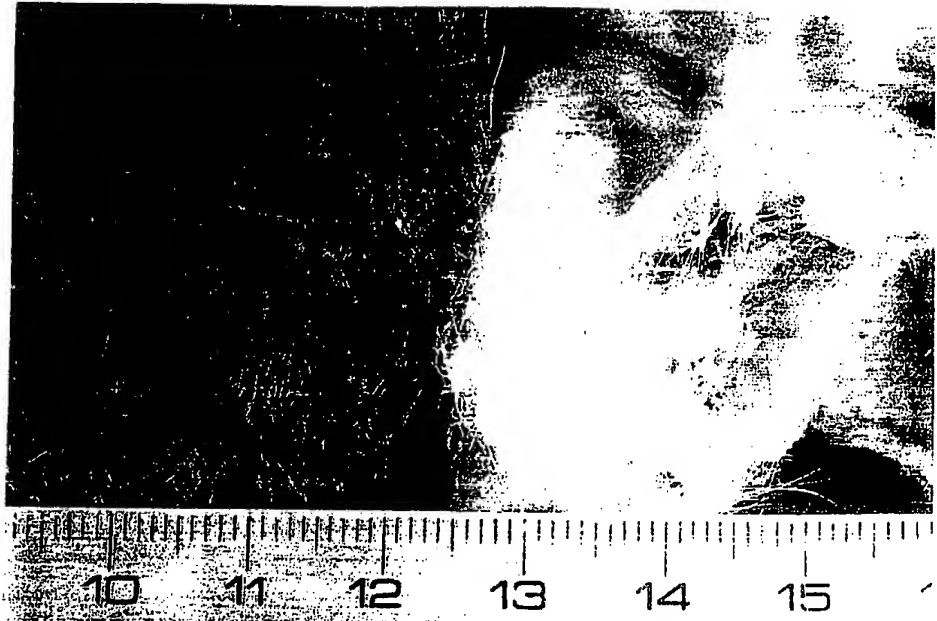


Fig. 1

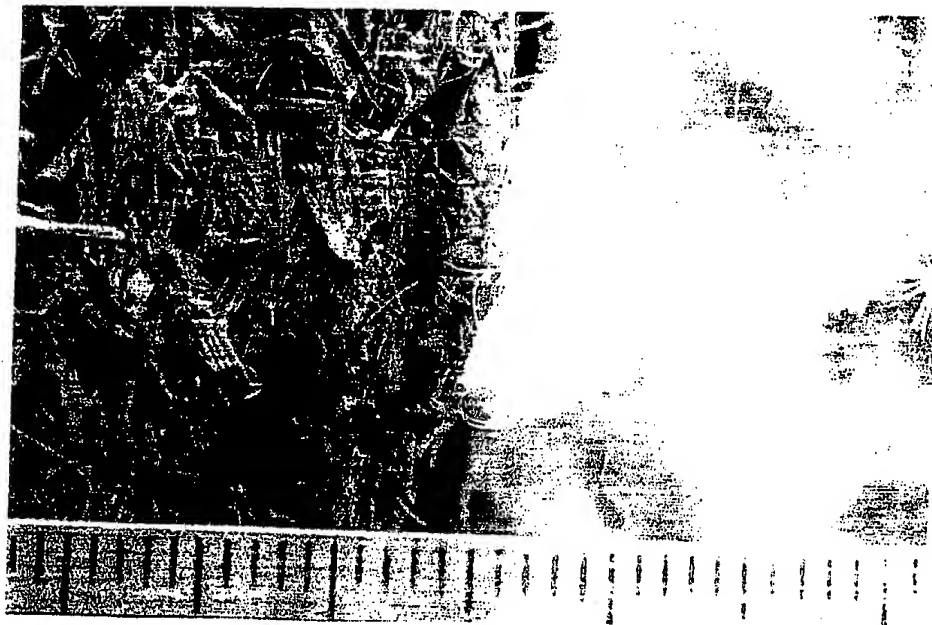


Fig. 2



Fig. 3

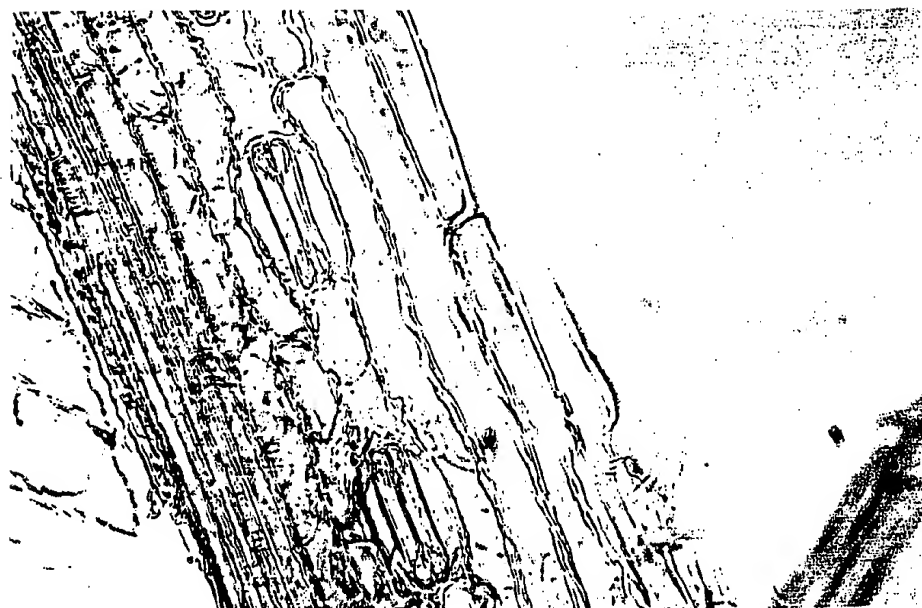


Fig. 4

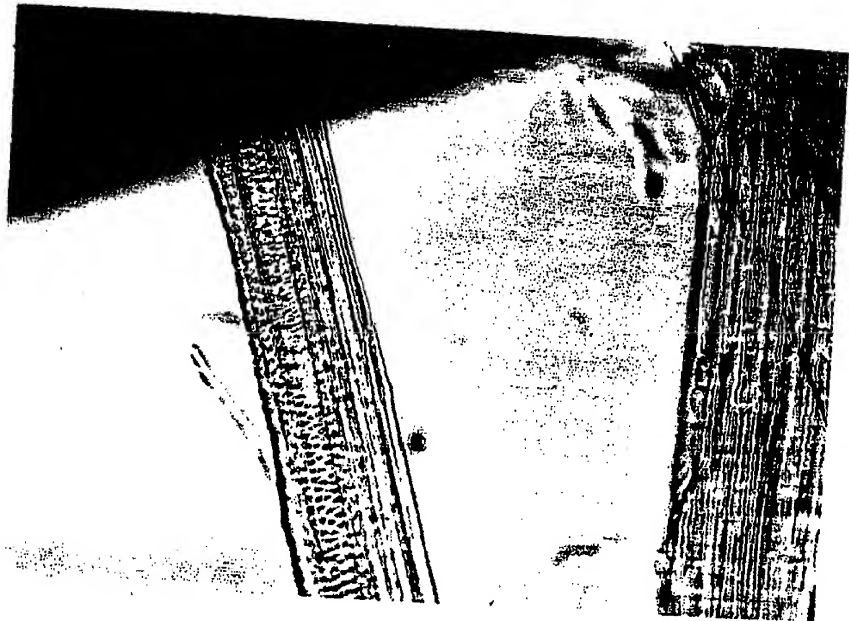


Fig. 5

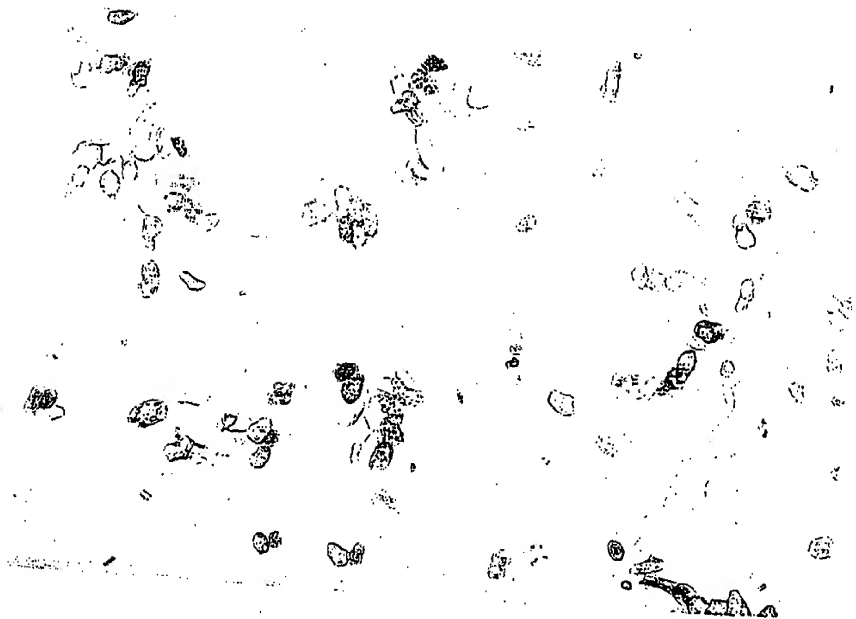


Fig. 6

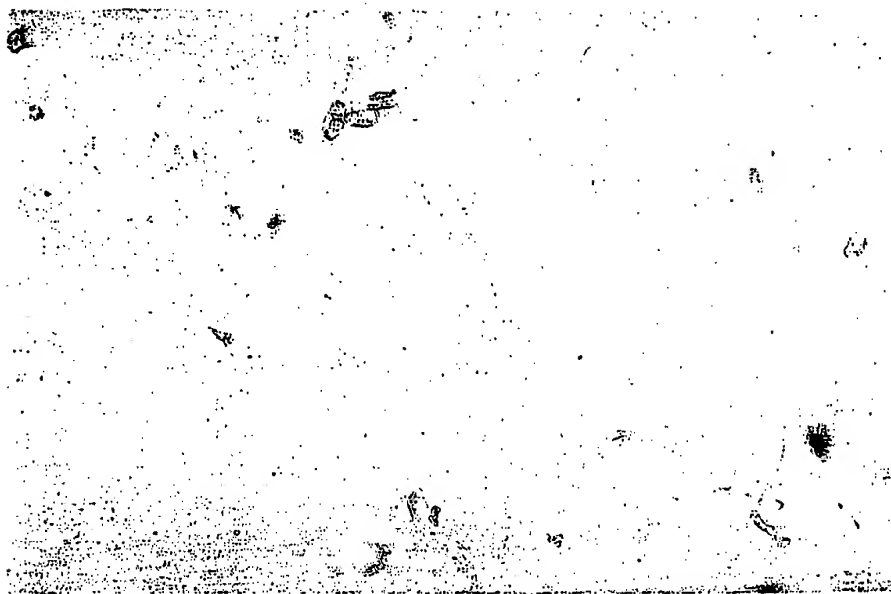


Fig. 7

5/7

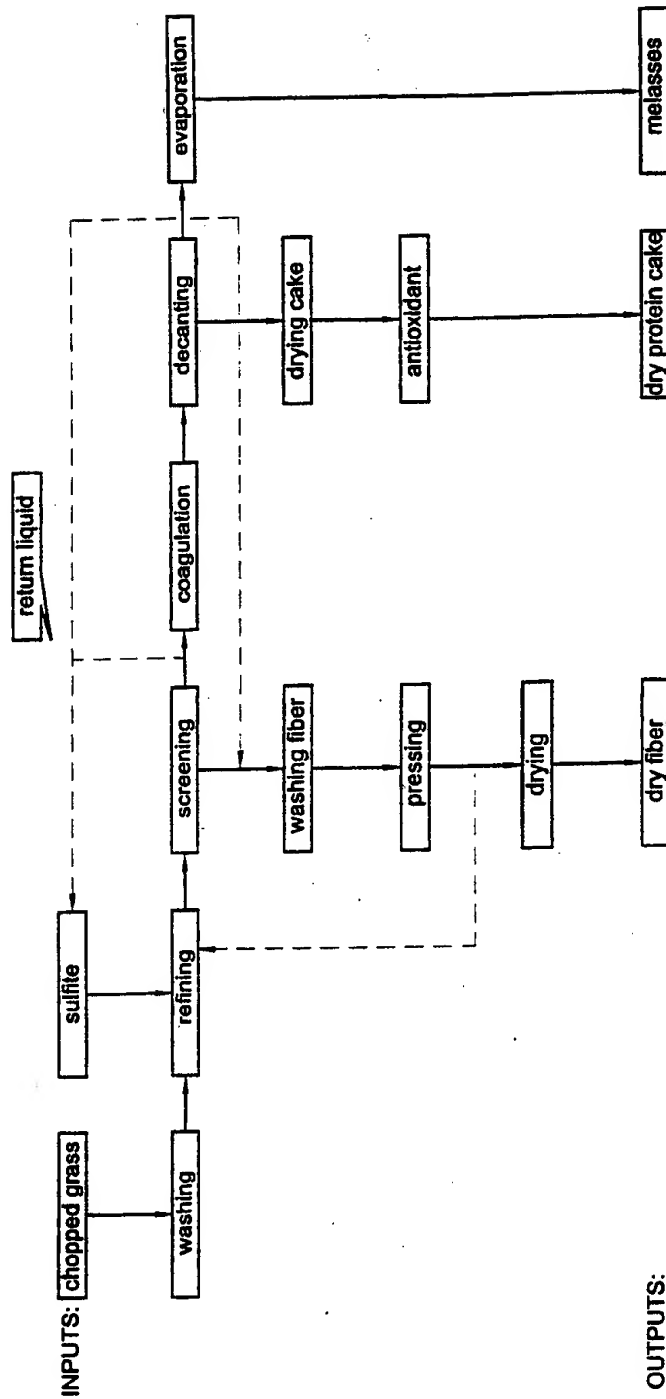


Fig. 8

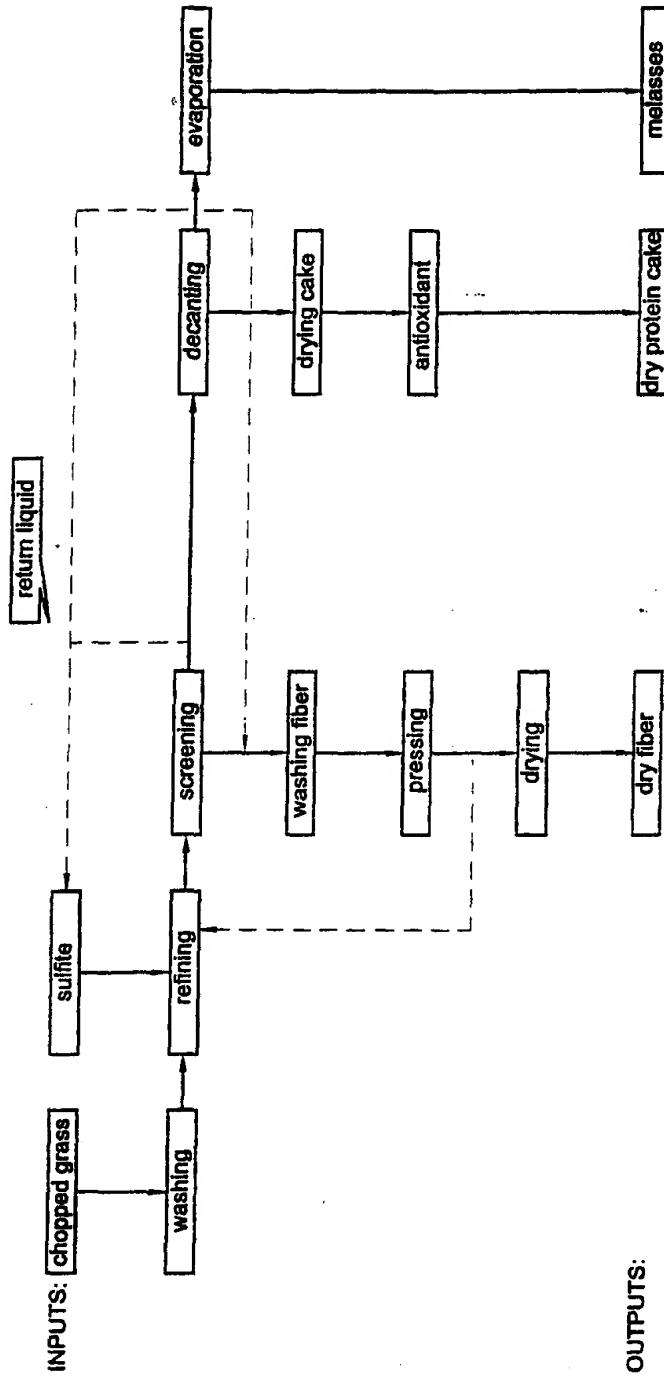


Fig. 9

7/7

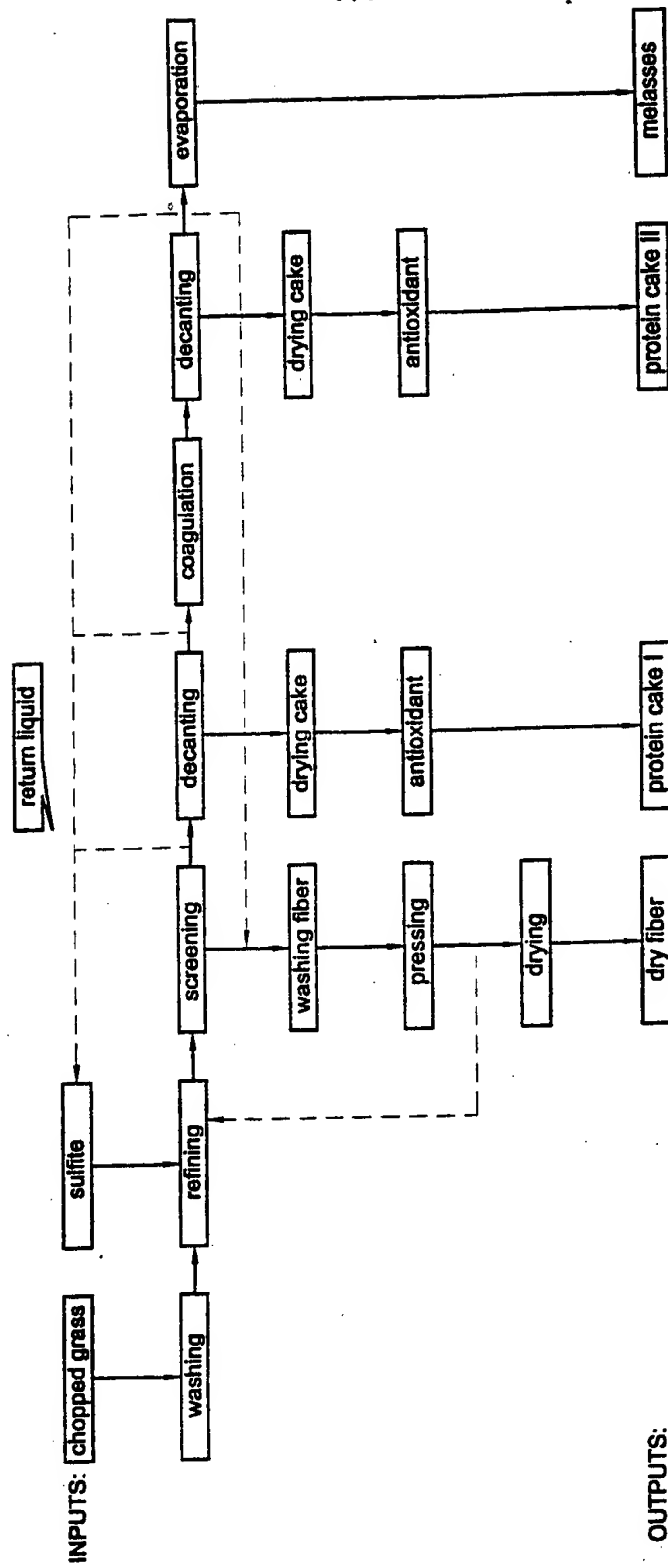


Fig. 10

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 001B1/42

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 001B A01H A23J A23K C08B C13D D21D D01C

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 5 464 160 A (DONALD MC.D.R.) 7 November 1995 (1995-11-07) cited in the application column 1, line 7 - line 45 column 2, line 13 - line 48 column 3, line 61 - column 6, line 61; claims 1,4,6,8; figures 12-14	1,3,5, 8-10,12
Y		6,7
A		14-16, 19,21
Y	DE 42 13 444 A (INSTITUT FÜR GENBIOLOGISCHE FORSCHUNG BERLIN GMBH) 28 October 1993 (1993-10-28) the whole document	6,7

-/-

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

6 April 2000

Date of mailing of the international search report

17/04/2000

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Munzer, E

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	NL 52 591 C (BÜHRMANN'S, G.H. PAPIERGROOTHANDEL) 15 January 1942 (1942-01-15) the whole document ---	1-5, 8-12, 19, 21
A	US 4 481 355 A (JASKOWSKI, M.C.) 6 November 1984 (1984-11-06) , sentence 8 - sentence 63 column 4, line 60 - column 6, line 9; claims 1, 14; figure 1 ---	1
A	GB 658 129 A (WELCH, J.N.) the whole document -----	1, 11

Information on patent family members

Int. .onal Application No

PCT/NL 99/00805

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 5464160	A	07-11-1995	NONE
DE 4213444	A	28-10-1993	NONE
NL 52591	C		NONE
US 4481355	A	06-11-1984	BR 8405960 A 10-09-1985 CA 1209071 A 05-08-1986 US 4568739 A 04-02-1986 US 4617383 A 14-10-1986
GB 658129	A		NONE